

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Hana Adámková

**Stanovení markerů nádorových onemocnění pomocí
uhlíkových pastových elektrod**

Determination of tumor markers using carbon paste electrodes

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof., RNDr. Jiří Zima, CSc.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Jiřího Zimy, CSc. a konzultantky RNDr. Hany Dejmkové, Ph.D., a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. a konzultantce RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a trpělivost při tvorbě diplomové práce.

Abstrakt

V této diplomové práci bylo provedeno elektrochemické stanovení kyseliny homovanilové (HVA) a vanilmandlové (VMA) na uhlíkové pastové elektrodě. Účelem této práce bylo nalezení optimálních podmínek pro stanovení těchto analytů metodami diferenční pulsní voltametrie (DPV) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED). Elektrochemické chování nejvíce záleží na hodnotě pH. Nejlepší výsledky byly získány v kyselém prostředí. Dosažené meze detekce metodou DPV jsou pro HVA $0,38 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pro VMA $0,25 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, v případě HPLC-ED jsou meze detekce pro HVA $0,7 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pro VMA $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Vyvinutá metoda byla použita pro stanovení kyseliny vanilmandlové a homovanilové ve vzorku moči; dosažené meze detekce jsou mírně nižší pro VMA ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) než v případě HVA ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$).

Klíčová slova: Kyselina homovanilová, kyselina vanilmandlová, uhlíková pastová elektroda, DPV, HPLC

Abstract

In this master's thesis, electrochemical determination of homovanillic acid (HVA) and vanillylmandelic acid (VMA) was performed on carbon paste electrode. The purpose of this thesis was finding out optimal conditions for determination of these analytes by differential pulse voltammetry (DPV) and high pressure liquid chromatography with a carbon paste electrode as an electrochemical detector (HPLC-ED). The electrochemical behavior of the compounds depends mainly on pH of the solution; the best results are obtained in acidic medium. The limits of detection for DPV method were for HVA $0,38 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ and for VMA $0,25 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. The limits of detection for HPLC-ED were for HVA $0,7 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ and for VMA $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Developed method was successfully used for the determination of homovanillic and vanillylmandelic acid in urine samples. With HPLC – ED the limits of detection $0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (HVA) and $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (VMA) were achieved.

Key words: Homovanillic acid, vanillylmandelic acid, carbon paste electrode, DPV, HPLC

SEZNAM ZKRATEK

3-MT	3-Methoxytyramin
A_p	Plocha píku
BR	Britonův-Robinsonův puf
CPE	Uhlíková pastová elektroda
CZE	Kapilární elektroforéza
DOPAC	Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová
DPV	Diferenční pulsní voltametrie
E	Potenciál
ED	Elektrochemická detekce
h_p	Výška píku
HPLC	Vysokoúčinná kapalinná chromatografie
HVA	Kyselina homovanilová
I	Proud
LC	Kapalinná chromatografie
LOD	Mez detekce
MS	Hmotnostní spektrometrie
R^2	Kvadrát korelačního koeficientu
SCE	Nasycená kalomelová elektroda
SPE	Extrakce na tuhé fázi
UV	Spektrometrická detekce v ultrafialové oblasti
VMA	Kyselina vanilmandlová

OBSAH

1. Úvod	8
2. Teoretická část	9
2.1. Stanovované látky	9
2.2. Metody stanovení	13
2.3. Uhlíková pastová elektroda	15
3. Experimentální část	16
3.1. Reagencie a přístrojové vybavení	16
3.2. Pracovní postupy	17
3.3. Voltametrické stanovení HVA a VMA na CPE	19
3.4. HPLC stanovení HVA a VMA	20
4. Výsledky a diskuze	21
4.1. Voltametrické stanovení HVA a VMA	21
4.1.1. Vliv pH	21
4.1.2. Vliv akumulace	24
4.1.3. Vliv pasivace	26
4.1.4. Koncentrační závislost HVA a VMA	28
4.1.5. Koncentrační závislost pro směsi kyselin	31
4.1.6. Voltametrické stanovení modelového vzorku	36
4.2. HPLC stanovení s UV a ED detekcí	37
4.2.1. Hydrodynamické voltamogramy	37
4.2.2. Opakovatelnost	39
4.2.3. Koncentrační závislost	40
4.2.4. Modelový vzorek moči	45
5. Závěr	49
6. Literatura	51

1. Úvod

V této práci se zabývám stanovením nádorových markerů, kyseliny homovanilové a vanilmandlové, které jsou vylučovány nádorovými buňkami. Tyto kyseliny jsou v těle přítomny ve vyšších dávkách při onemocnění neuroblastomem a feochromocytomem. Vyšší hladiny mohou být ovšem způsobeny i jinými nemocí. Tyto nádorové markery jsou vhodné pro vyhledávání neuroblastomů, které postihují děti v raném dětství. Svoji roli hrají i při recidivitě nádorů, včasným zachytem opakovaného vzplanutí nádoru.

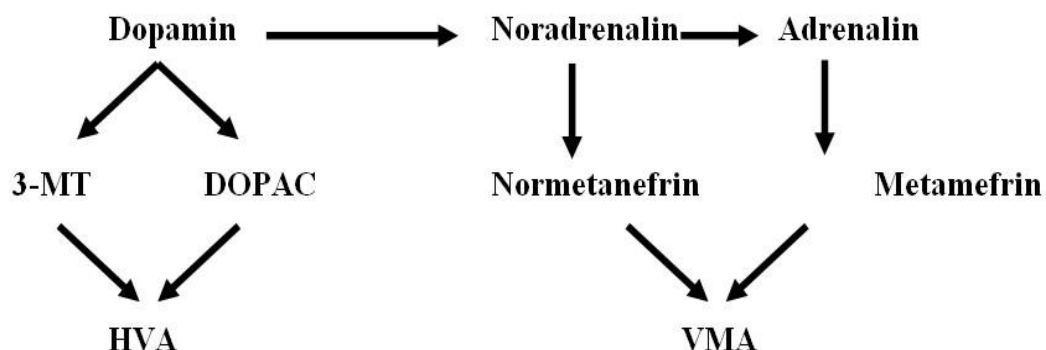
Tato práce si klade za cíl elektrochemické stanovení kyseliny vanilmandlové a kyseliny homovanilové za použití voltametrických a amperometrických metod s využitím uhlíkové pastové elektrody (CPE) jako detektoru, tedy nalézt optimální podmínky pro stanovení obou látek ve směsi tak, aby bylo dosaženo nejnížší meze detekce. Využitelnost metody bude ověřena stanovením ve vzorku moči.

2. Teoretická část

2.1. Stanovované látky

Kyselina homovanilová (HVA) a kyselina vanilmandlová (VMA) jsou hlavními metabolity katecholaminů (1). Jsou klasifikovány jako neurotransmitery a hormony v centrálním nervovém systému člověka regulující fyziologické procesy, neurologické, psychiatrické, endokrinní a kardiovaskulární onemocnění (2, 3, 4).

Katecholaminy jsou organické molekuly obsahující ethylaminovou skupinu a katecholové jádro, které je tvořeno benzenovým jádrem se dvěma hydroxylovými skupinami v polohách 3 a 4. Biosyntéza katecholaminů začíná hydroxylací tyrosinu. Kyselina homovanilová a vanilmandlová jsou konečnými metabolickými produkty tří hlavních katecholaminů a to dopaminu, noradrenalinu a adrenalinu (2). Kyselina vanilmandlová vzniká jako hlavní metabolit noradrenalinu a adrenalinu přes *O*-methylovaný noradrenalin do normetanefrinu a adrenalinu k metamefrinu, následuje oxidativní deaminace obou metabolitů na VMA (3, 5), která se následně vylučuje močí. Kyselina homovanilová je produkt metabolismu dopaminu (Obr. 1).



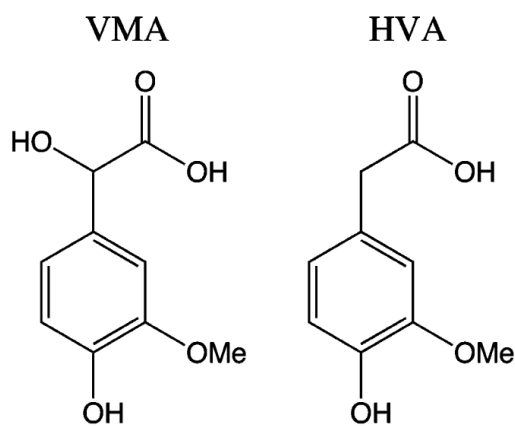
Obr. 1: Zjednodušené schéma metabolismu dopaminu.

Vysvětlivky: 3-MT (3-methoxytyramin), DOPAC (kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová), HVA (kyselina homovanilová), VMA (kyselina vanilmandlová) (6).

Vysoké koncentrace těchto látek můžeme nalézt v moči a v krevní plasmě (3). Zvýšené množství VMA a HVA v moči a plasmě indikuje přítomnost mnoha onemocnění, zejména nádorů neuroblastomu (7, 8, 9) a feochromocytomu (9, 10). Neuroblastom patří do skupiny embryonálních maligních nádorů a je to třetí nejčastější nádorové

onemocnění u dětí do pěti let. U adolescentů je neuroblastom poměrně vzácný a u dospělých se nevyskytuje. Projevem tohoto nádoru je celková únava, nechutenství, teplota, anémie a bolest kostí. Dalším projevem produkce katecholaminů je pocení, návaly zarudnutí a bolesti hlavy. Primárně se nádor objevuje v dutině břišní (11). Prognóza ve třetím stádiu nemoci je špatná i přes agresivní léčbu, která zahrnuje resekci nádoru a transplantaci kostní dřeně. Pacienti se dožívají méně než pěti let (12). Feochromocytom je většinou neuroendokrinní nádor s benigní povahou, jehož primárním projevem je hypertenze. Dalšími příznaky jsou bolesti hlavy, pocení, zblednutí a diabetes (13). Zvýšená produkce HVA a VMA také může souviset s Parkinsonovou nemocí (14), schizofrenií (15), Toretovým syndromem a autismem (4). Zvýšené množství bylo nalezeno i u pacientů trpících depresí (16) a se sebevražednými myšlenkami (17).

Metabolity katecholaminů jsou v kyselém prostředí stabilní, v neutrálních a alkalických podmínkách oxidují na chinonový druh (18). HVA a VMA jsou velmi hydrofilní (2), velmi polární (19), mají kyselý charakter a jsou ve vodě rozpustné. I přes strukturní podobnost mají jiné hodnoty disociačních konstant. Další vlastnosti jsou shrnuty v tabulce 1.

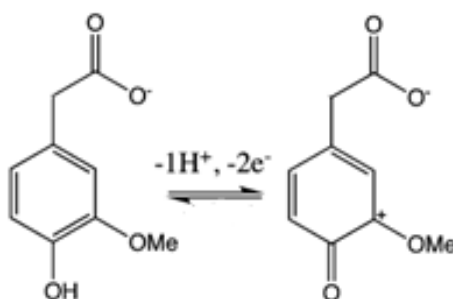


Obr. 2: Strukturní vzorec kyseliny homovanilové a vanilmandlové (20).

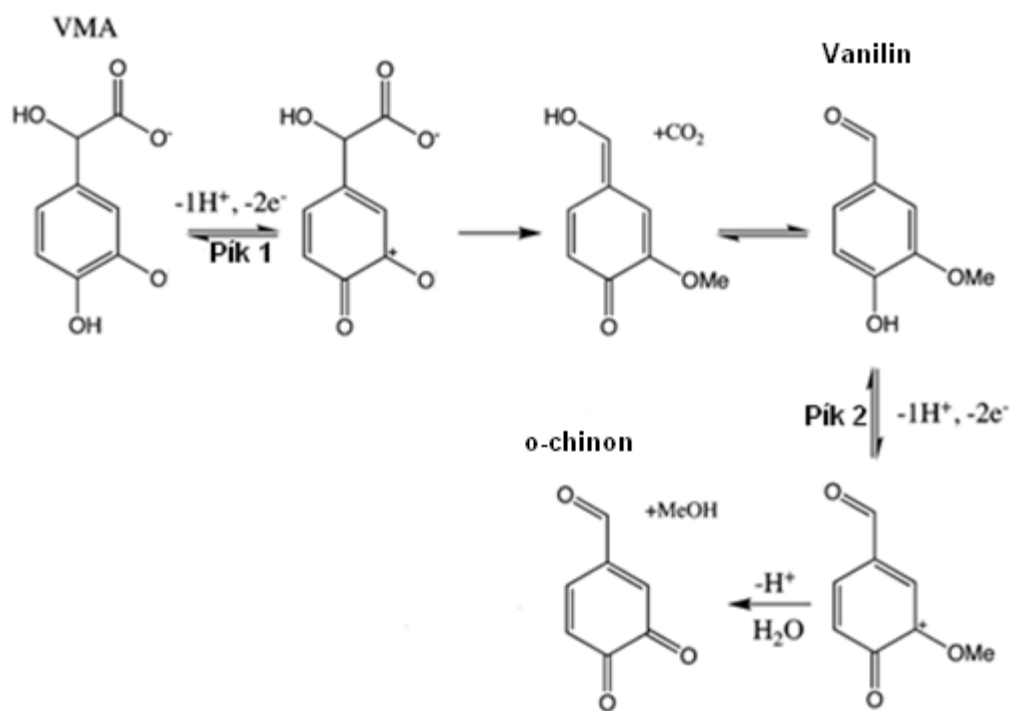
Tabulka 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti VMA a HVA.

Parametry	HVA	VMA
IUPAC jméno	2-(4-hydroxy-3-metoxyfenyl)etanová kyselina	2-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-metoxyfenyl)etanová kyselina
Sumární vzorec	C ₉ H ₁₀ O ₄	C ₉ H ₁₀ O ₅
CAS číslo	306-08-1	55-10-7
Molekulová hmotnost	182,17 g·mol ⁻¹	198,17 g·mol ⁻¹
pK _{a1} ; pK _{a2}	4,35; 10,34	3,44; 9,93
Rozpustnost ve vodě	9,11 g·l ⁻¹	16,22 g·l ⁻¹

Struktura HVA a VMA je velmi podobná, rozdíl mezi nimi je v hydroxylové skupině u VMA (21). I přes strukturní podobnost vykazují jiné elektrochemické chování (22). Kyselina vanilmandlová je oxidována ve dvou krocích, mechanismem je dekarboxylace na vanilin, který je dále oxidován. Tyto dva oxidační kroky se projeví i ve výsledném voltamogramu dvěma píky (Obr. 4). Je možné, že právě absence hydroxylové skupiny u HVA, která má za následek zpomalení druhého oxidačního kroku a potřebuje další molekulu vody ke tvorbě vanilinu, má za následek tvorbu jednoho píku (Obr. 3) (20, 23).



Obr. 3: Mechanismus oxidace HVA (23).



Obr. 4: Mechanismus oxidace VMA. Kyselina vanilmandlová se oxiduje ve dvou krocích na vanilin a *o*-chinon (20).

2.2. Metody stanovení

Ke stanovení HVA a VMA je zapotřebí citlivých analytických metod vzhledem k jejich nízké koncentraci v biologických tekutinách. Mezi nejčastější metody stanovení patří separační techniky s použitím nejrůznějších detektorů.

Jelikož HVA a VMA jsou elektroaktivní látky, je zřejmé, že nejčastější stanovení je pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí (1, 24, 25, 26). Elektrochemická detekce je považována za velmi selektivní (21) a citlivý detekční systém (1, 25, 21). Katecholaminy emitují přirozenou fluorescenci v UV oblasti, proto je možné použít fluorescenční detektor (27, 28). Emitované záření není dostatečně silné ve velmi malých koncentracích v reálných vzorcích (29), a proto je zapotřebí derivatizace (2). Další vhodné způsoby detekce jsou hmotnostní spektrometrie (8, 30, 31, 32) a chemiluminiscenční detekce (32). Mezi techniky, které můžeme použít ke stanovení HVA a VMA, řadíme GC-MS (4, 34) a kapilární elektroforézu s UV detektorem (35), hmotnostním spektrometrem (37) a elektrochemickým detektorem (21).

Běžná praxe pro měření obou kyselin vyžaduje sběr moči během 24 hodin, což není vždy spolehlivé zvláště u pediatrických pacientů. Z těchto důvodů se vzorky upravují na hodnotu vylučovaného kreatininu (7).

Vzorky jsou mnohdy před samotným stanovením upravovány. Nejčastěji jsou využívány extrakce, při kterých dochází k zakoncentrování analytů a oddělení matrice (2, 4, 9, 25). V některých případech se vzorek pouze přefiltruje a injektuje do kolony (1, 21, 31 32, 35). Jak jde vidět z tabulky 2, jsou LOD typicky mezi v koncentračním rozmezí 10^{-7} a 10^{-8} mol·dm⁻³. V případě použití metody HPLC – ED jsou až 10^{-9} mol·dm⁻³ (40). Ve většině případů nebyla využita žádná předúprava vzorku, pouze Dutrieu a kol., který upravil vzorek extrakcí a až potom provedl samotnou HPLC – ED analýzu. Jeho metodou bylo dosaženo nejvyšší meze detekce ve výčtu metod v tabulce 2 (25). Přehled dalších metod a jejich mezí detekce je v tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled separačních technik pro stanovení VMA a HVA. Uvedené jsou použité detektory a jejich LOD pro VMA a HVA.

Metoda	Typ detektoru	VMA ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	HVA ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	Citace
MEKC fluorescence	-	0,150	0,170	38
LC - MS	-	0,035	0,016	31
CZE - ED	amperometrický	0,018	0,035	36
CZE - ED	amperometrický	0,790	1,3	21
CZE - ED	amperometrický	0,025	0,016	39
(extrakce) HPLC - ED	coulometrický	-	0,080	9
HPLC - ECD	-	0,012	0,009	40
(extrakce) HPLC – ED	coulometrický	0,505	2,7	25

2.3. Uhlíková pastová elektroda

Uhlíková pastová elektroda byla poprvé představena světu v roce 1958 v jednostránkové publikaci od R. Adamse (41). Adams původně chtěl vyrobit kapající uhlíkovou elektrodu, ale přidáním většího množství uhlíkového prášku vznikla pevná elektroda na bázi uhlíkové pasty (41, 42).

Uhlíková pastová elektroda patří mezi heterogenní elektrody (43) a je to směs uhlíkového prášku a pastovací kapaliny se širokým potenciálovým oknem, v kyselém prostředí -1,0 V až +1,5 V vs. SCE (44). Pasta se vyrobí rozetřením obou složek v třecí misce a naplní se do teflonového těla elektrody. První CPE byla vyrobena z 1 g grafitu a 7 ml bromoformu (41). Pastu je vhodné uchovávat v destilované vodě, aby se chránila před vysycháním (42).

Kapalná složka elektrody slouží jako pojivo uhlíkových částic a zároveň rozhoduje o vlastnostech past (42). Mezi nejčastější pastovací kapaliny patří silikonový či minerální olej (45). Pastovací kapaliny by měly být málo těkavé, vysoce viskózní a minimálně rozpustné ve vodě (46). Uhlíkový prášek by měl mít jednotnou velikost částic, být chemicky čistý a mít nízkou absorpční schopnost (46).

Tyto elektrody mají nízký ohmický odpor řádově v desítkách ohmů a mají hydrofobní povahu, důsledkem čeho je zpomalená reakční kinetika (42).

Výhodou uhlíkové pastové elektrody je její široká oblast použití. Můžeme stanovovat anorganické i organické látky za splnění základní podmínky elektroaktivity. Další z výhod je jednoduchá obnovitelnost povrchu elektrody, široké potenciálové okno, nízký proud pozadí, nenáročná příprava elektrody a především jejich jednoduchá modifikovatelnost, která zlepšuje jejich elektrochemické chování (42, 43, 44, 45, 46).

3. Experimentální část

3.1. Reagencie a přístrojové vybavení

Pro voltametrické stanovení byl použit Eco-Tribo polarograf (Eco-Trend Plus, Praha, Česká republika) s programem Polar Pro v. 5.1. Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda složená z teflonového těla s nerezovým pístem s aktivním místem o průměru 2 mm. Referenční elektroda byla argentchloridová elektroda ($3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl, Monokrystaly Turnov, Česká republika), pomocná elektroda byla platinová (Monokrystaly Turnov, Česká republika).

K filtrování vzorku byly použity stříkačkové filtry Pro Fill ($0,45 \mu\text{m}$, Fisher Scientific).

Úprava pH byla realizována pomocí pH-meter 3510 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, Staffordshire, UK).

Spektra zásobních roztoků látek pro kontrolu stability byla měřena spektrometrem Agilent 8453 (Agilent Technologies, LA, USA).

HPLC aparatura sestávala z kolony Kromasil[®] Eternity-5-FenylHexyl 4,6 x 150 mm (Akzo Nobel, Nizozemí), dávkovače se smyčkou o objemu 20 μl (Ecom, Praha, ČR), degasseru DG 4014 (Ecom, Praha, ČR), UV/VIS detektoru Sapphire (Ecom, Praha, ČR) a z amperometrického detektoru ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha, ČR) a z gradientové pumpy Beta 10 (Ecom, Praha, ČR). Zaznamenání a vyhodnocení chromatogramů bylo provedeno pomocí programu Clarity verze 3.0.5.505 (Clarity Software, Solihull, UK).

3.2. Pracovní postupy

Příprava zásobních roztoků kyselin homovanilové (HVA) a vanilmandlové (VMA) pro voltametrické stanovení

Zásobní roztoky HVA (98%, Sigma-Aldrich, USA) a VMA (98%, Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byly připraveny navážením 18,21 mg HVA a 19,817 mg VMA. Navážky byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk a doplněny na objem 100 ml deionizovanou vodou (Millipore Q-plus System, Millipore, USA). Roztoky s nižší koncentrací byly připravovány ze zásobních roztoků ředěním.

Příprava směsného zásobního roztoku kyselin homovanilové (HVA) a vanilmandlové (VMA) pro HPLC stanovení

Směsný roztok kyselin o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl připraven ze zásobních roztoků jednotlivých kyselin a doplněn na objem deionizovanou vodou a acetonitrilem (Merck, Darmstadt, Německo) v poměru 75:25 (V/V).

Příprava pufrů

Kyselá složka pufru Brittonova-Robinsonova pufru byla připravena smísením kyseliny borité (p.a., Lachema, Brno, ČR), kyseliny fosforečné (p.a., 85%, Lach-Ner, Neratovice, ČR) a kyseliny octové (p.a., 99%, Lach-Ner, Neratovice, ČR), všechny o koncentraci $0,04 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Zásaditá složka je tvořena vodným roztokem hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) o koncentraci $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Požadovaného pH bylo dosaženo smícháním obou složek a pH změřeno pomocí pH metru.

Fosfáto-acetátový pufr byl připraven z $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kyseliny fosforečné a z $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kyseliny octové a upraven na příslušné pH $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ hydroxidem sodným.

Příprava uhlíkové pastové elektrody

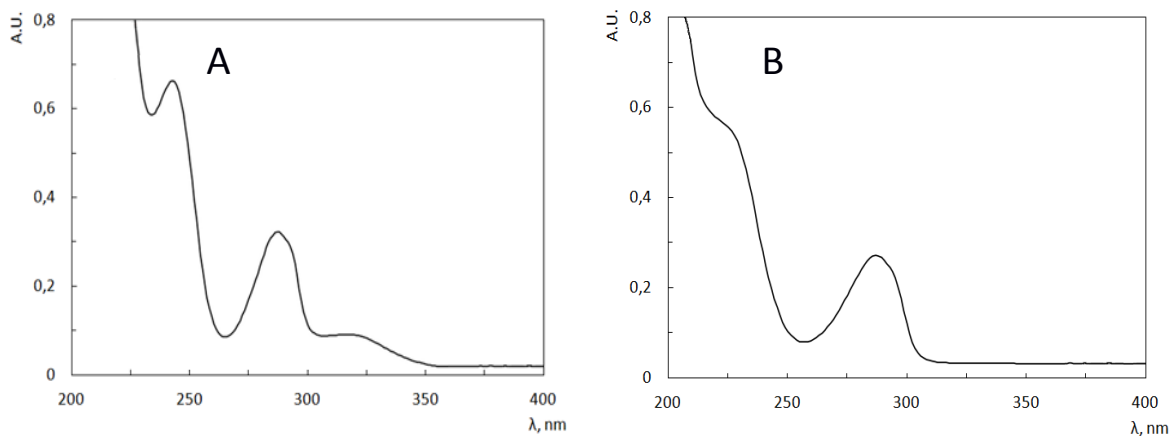
Bylo naváženo 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku (Alfa Aesar, Karlsruhe, Německo) o průměru $0,4 - 12 \mu\text{m}$ a rozetřeno v porcelánové třecí misce se 110 μl minerálního oleje (Sigma-Aldrich, USA). Poté byla tato pasta naplněna do teflonového těla elektrody.

Vyhodnocení

Každé měření bylo provedeno nejméně třikrát. Naměřená data byla vyhodnocena metodou lineární regrese a mez detekce byla vypočtena jako koncentrace, která odpovídá trojnásobku směrodatné odchylky měření nejnížší stanovované koncentrace a vydělená směrnici dané kalibrační závislosti.

Stabilita zásobních roztoků HVA a VMA

Stabilita zásobních roztoků o koncentraci $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byla spektrofotometricky sledovaná v 1 mm křemenných kyvetách proti vodě v absorpčním rozmezí 200 – 400 nm (Obr. 5). Absorbance byla měřena po dobu 111 dnů. Ze změřených spekter je patrné, že HVA má jedno absorpční maximum při vlnové délce 279 nm a VMA má dvě absorpční maxima při vlnových délkách 231 a 279 nm. Směrodatná odchylka absorbance na absorpčních maximech po dobu sledování stability je 1,2 % pro HVA a 0,9 % a 1,1 % pro VMA. V uvedeném časovém rozmezí není pozorován žádný pokles či nárůst absorbance. Bylo prokázáno, že zásobní roztoky HVA a VMA jsou při uchovávání v temnu a při teplotě 4 – 8 °C stabilní minimálně po dobu 111 dnů.



Obr. 5: Absorpční spektrum zásobního roztoku VMA (A) a HVA (B) o koncentraci $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, měřeno proti vodě v 1 mm křemenných kyvetách .

3.3. Voltametrické stanovení HVA a VMA na CPE

Ke stanovení HVA a VMA byla použita technika diferenční pulsní voltametrie (DPV). Jednotlivé vzorky, které byly použity při zjišťování optimálních podmínek a koncentrační závislosti, byly připraveny ze zásobních roztoků HVA a VMA o koncentraci $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a doplněny BR pufrům na celkový objem 10 ml. Povrch CPE byl před každým měřením mechanicky očištěn pomocí filtračního papíru navlhčeného destilovanou vodou, pokud není napsáno jinak. Měřilo se za podmínek uvedených v tabulce 3.

Tabulka 3: Parametry voltametrického měření na CPE.

	HVA	VMA
Rozsah měření	0 - 1000 mV	0 – 1200 mV
Rychlost polarizace	20 mV/s	
Výška pulsu	50 mV	
Šířka pulsu	80 ms	

Při optimalizaci stanovení HVA a VMA pomocí CPE byla sledována závislost odezvy elektrody na pH v rozmezí 2 až 12, vliv pasivace elektrody, akumulace stanovovaných látek na povrchu CPE a opakovatelnost měření. Koncentrační závislosti obou látek byly změřeny při nalezených optimálních podmínkách. Vzorky směsných roztoků byly připraveny ze zásobních roztoků HVA a VMA tak, aby vznikla sada roztoků o koncentraci 1 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

3.4. HPLC stanovení HVA a VMA

Byl připraven zásobní roztok směsi HVA a VMA o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a obsahu acetonitrilu 25 %. Objem dávkovaného vzorku byl 20 μl . Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu s fosfáto-acetátovým pufrém (25:75) a průtoková rychlost činila $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. V případě modelového vzorku byl použit gradientový program. Počáteční poměr pufr:ACN byl 5:95 a byl lineárně měněn na poměr 75:25 během 10 minut.

Elektrochemický detektor pracoval ve tříelektrodovém zapojení typu „wall-jet“ s CPE jako pracovní elektrodou. Zvolená vlnová délka pro UV detektor byla 279 nm, při této vlnové délce obě kyseliny mají absorpční maximum (Obr. 5).

Při optimalizaci podmínek pro stanovení směsi HVA a VMA byly proměřeny hydrodynamické voltamogramy, ze kterých bylo určeno vhodné napětí vkládané na elektrodu pro detekci. Koncentrační závislosti byly naměřeny při optimálních podmínkách v rozmezí $0,8 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Následně byly změřeny metodou standardního přídatku modelové vzorky moči. Standardní přídatky k 10 ml vzorku moči (10x zředěné deionizovanou vodou) byly v rozmezí 0,1 – 10 ml směsi kyselin o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Koncentrační závislosti modelového vzorku byly naměřeny v desetkrát zředěné moči, která byla získána ve dni analýzy.

4. Výsledky a diskuze

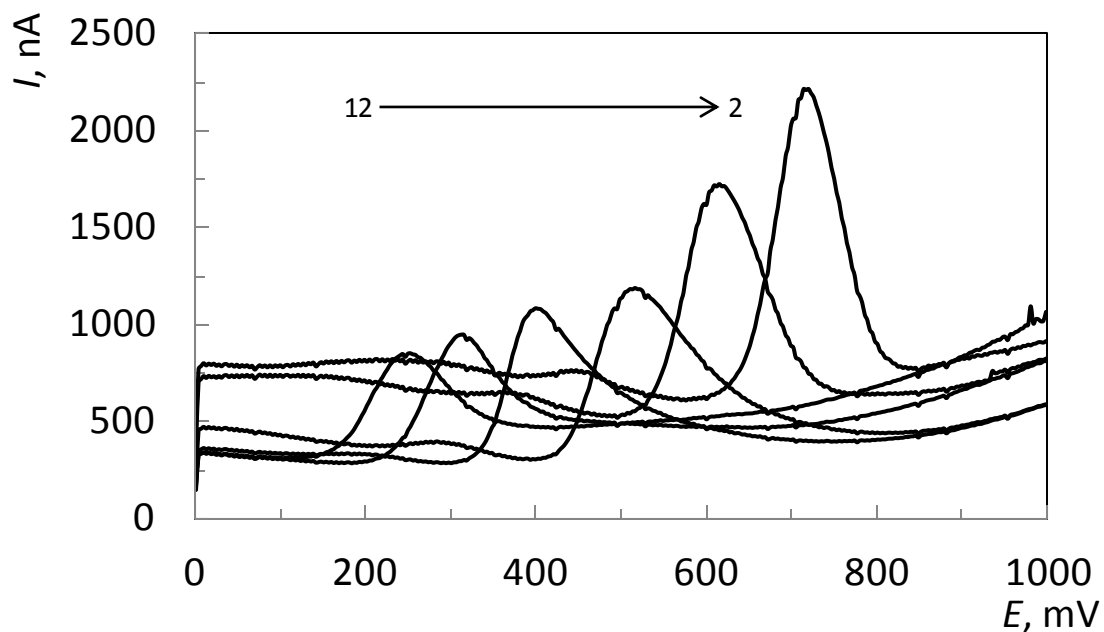
4.1. Voltametrické stanovení HVA a VMA

4.1.1. Vliv pH

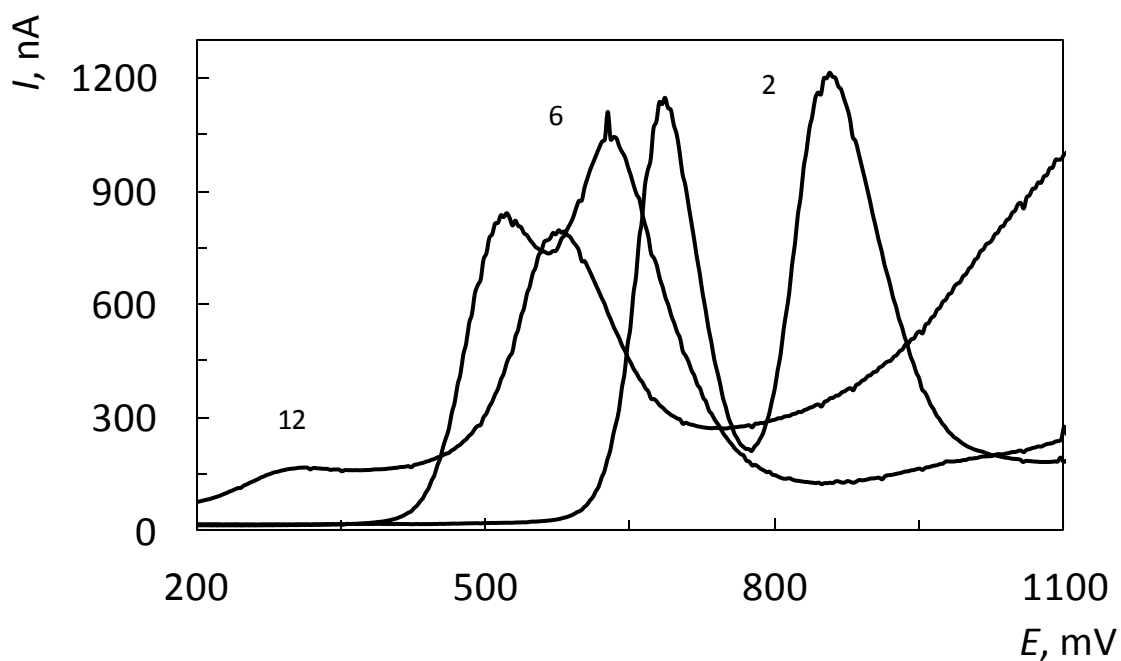
V rámci optimalizace podmínek pro stanovení HVA a VMA se zkoumal vliv pH prostředí na elektrochemické chování dané látky. Zkoumané pH bylo v rozmezí 2 až 12. HVA v celém rozsahu pH poskytovala jeden pík (Obr. 6), což odpovídá oxidaci hydroxylové skupiny navázané na aromatickém kruhu (Obr. 3) a VMA dva píky (Obr. 7), které se zvyšujícím se pH splývají. Při posunu pH do alkalické oblasti docházelo k posunu k nižším hodnotám potenciálů a také ke snižování výšky píků. Pro obě látky bylo vybráno optimální pH 2, při kterém je výška píku dané látky nejvyšší (Obr. 9). Potenciál píku HVA je při tomto pH 718 mV, potenciál VMA pro pík 1 je 717 mV a pro pík 2 je 870 mV (Obr. 8). Hodnoty naměřených potenciálů a proudů jsou shrnuty v tabulce 4. Vliv pH na proud a potenciál píků HVA a VMA je znázorněn v grafu (Obr. 6, 7).

Tabulka 4: Naměřené potenciály a proudy píků pro HVA a VMA ($c = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Prostředí bylo upraveno BR puforem na pH 2 – 12, měřeno metodou DPV ($n = 3$).

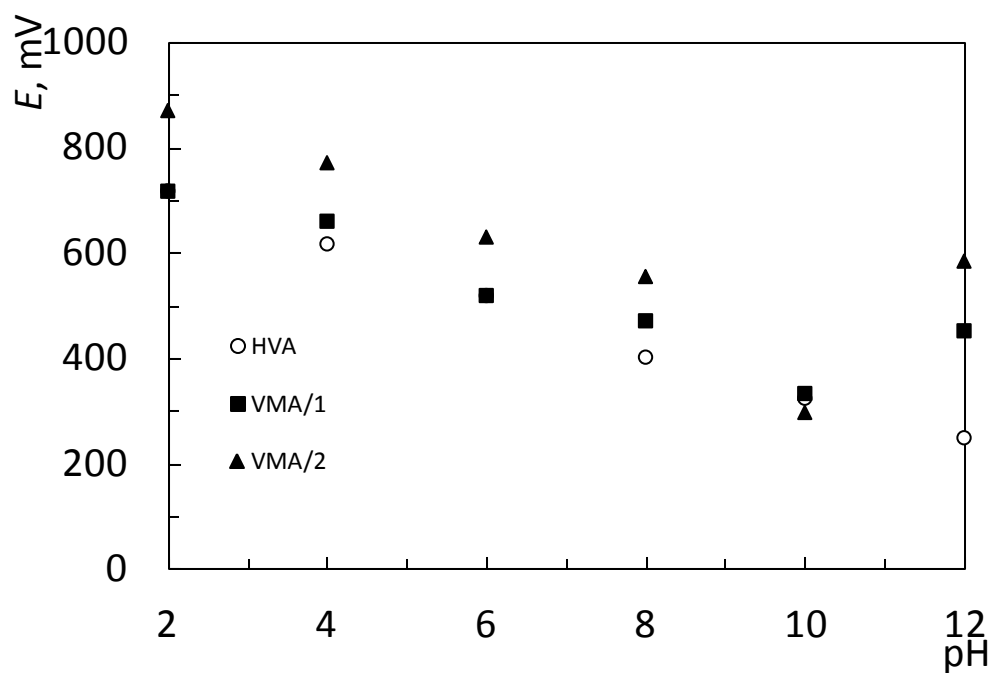
pH	HVA		VMA			
	E_p [mV]	I_p [nA]	E_{p1} [mV]	E_{p2} [mV]	I_{p1} [nA]	I_{p2} [nA]
2	718	1489	717	870	1087	1089
4	617	1149	660	771	705	840
6	519	926	519	630	782	982
8	402	806	471	555	624	776,
10	324	556	333	452	185	453
12	249	488	297	584	55	584



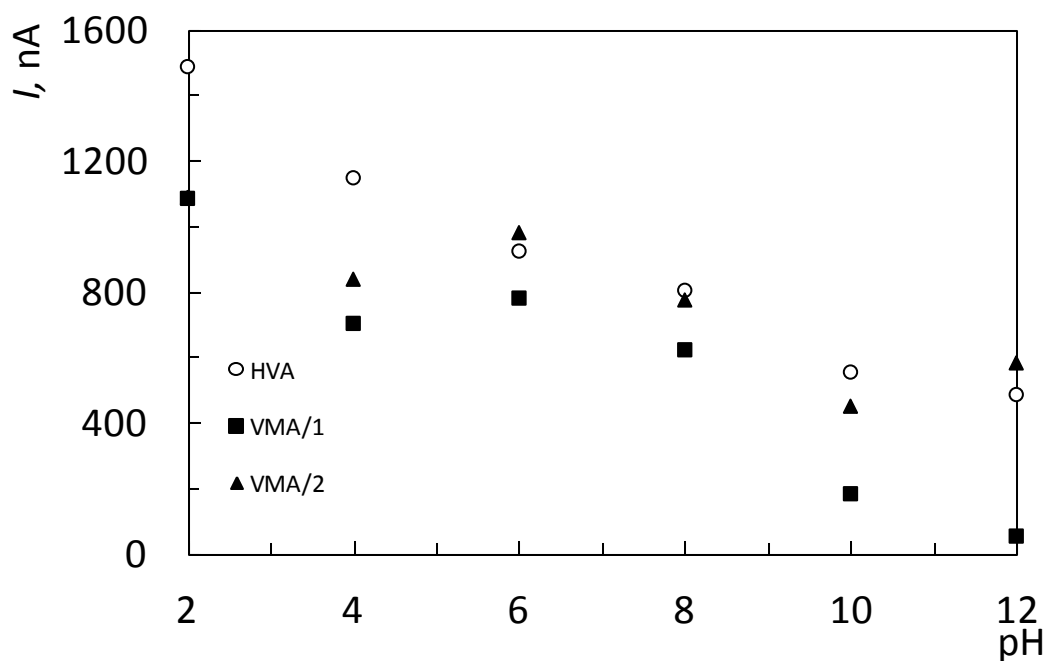
Obr. 6: DP voltamogramy $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HVA v prostředí BR pufru o daném pH na uhlíkové pastové elektrodě. Čísla uvedená nad křivkami odpovídají hodnotám pH BR pufru po dvou jednotkách.



Obr. 7: DP voltamogramy $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ VMA v prostředí BR pufru o daném pH na uhlíkové pastové elektrodě. Čísla uvedená nad křivkami odpovídají hodnotám pH BR pufru.



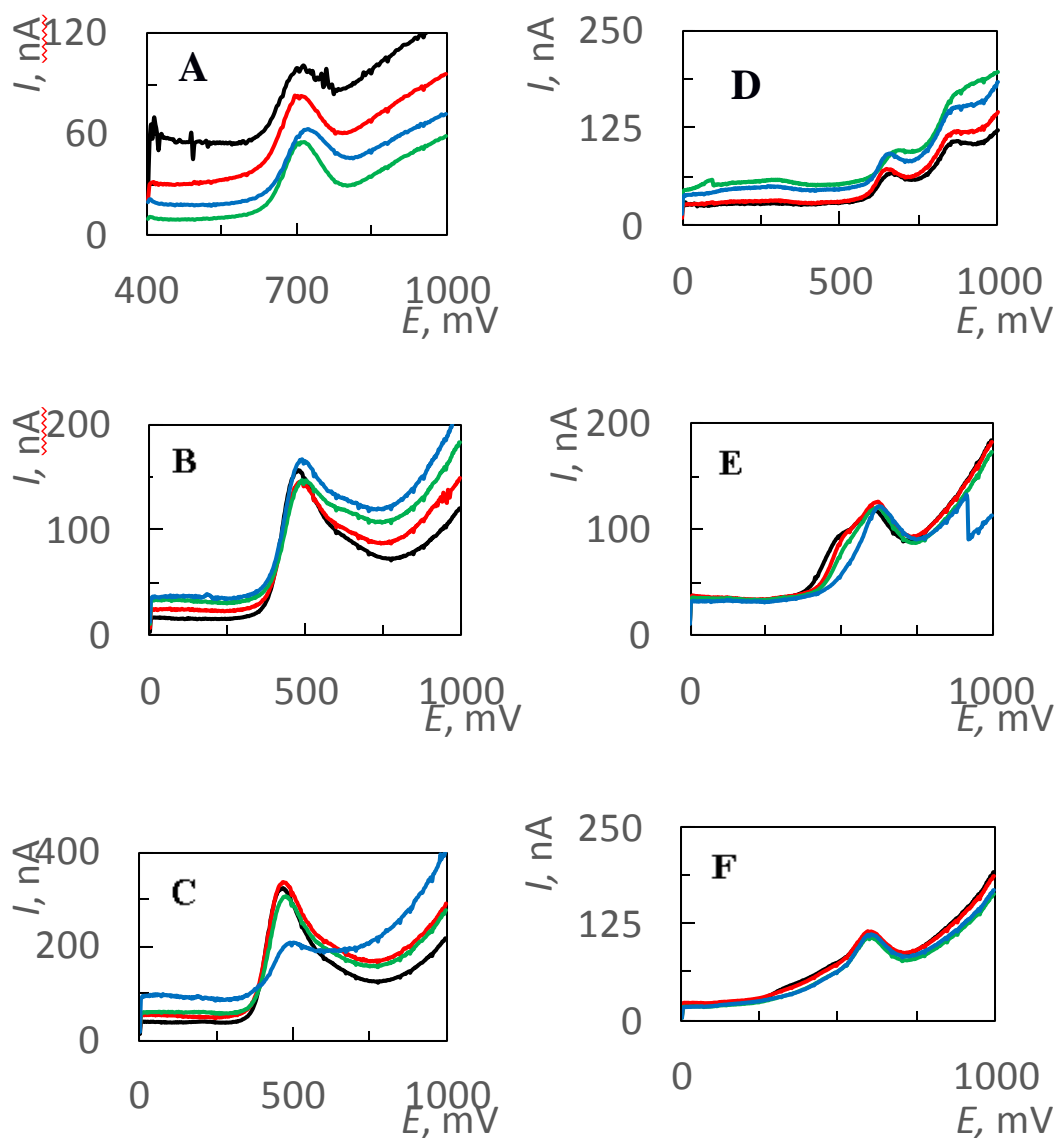
Obr. 8: Grafické znázornění závislosti potenciálu píků na pH pro HVA a VMA.
V prostředí BR pufru v rozmezí pH 2 – 12 o koncentraci HVA a VMA $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



Obr. 9: Grafické znázornění závislosti výšky píků na pH pro HVA a VMA.
prostředí BR pufru v rozmezí pH 2 – 12 o koncentraci VMA $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

4.1.2. Vliv akumulace

Dále byl prozkoumán vliv akumulace stanovovaných látek na CPE za účelem zvýšení odezvy. Měření byla provedena v roztocích o pH 2, 7 a 10 a elektroda byla ponořena v roztoku v časových intervalech 0, 30, 60 a 180 s před měřením. Koncentrace použitých roztoků závisela na pH (Tabulka 5), protože v alkalickém prostředí nebylo možné vyhodnotit pík o koncentraci $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Nebyl pozorován nárůst výšky píků s dobou akumulace (Obr. 10), a proto nelze využít akumulčního kroku ke zvýšení odezvy.



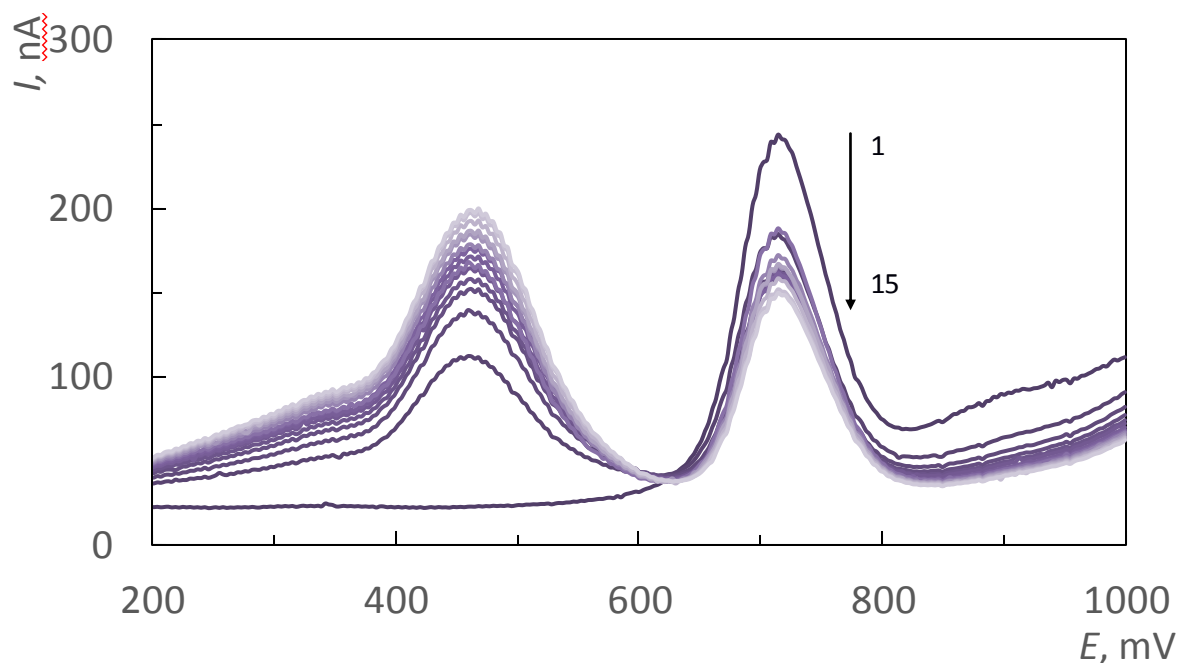
Obr. 10: Vliv akumulace. DP voltamogramy různé doby akumulace 0, 30, 60 a 180 s při různém pH 2 (A, D), 7 (B, E) a pH 10 (C, F) pro kyseliny HVA (A, B, C) a VMA (D, E, F). Koncentrace roztoků: pH 2 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), pH 7 (HVA: $20 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, VMA: $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a pH 10 (HVA: $20 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, VMA: $8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$).

Tabulka 5: Přehled studovaných hodnot pH pro akumulaci při různých koncentracích HVA a VMA.

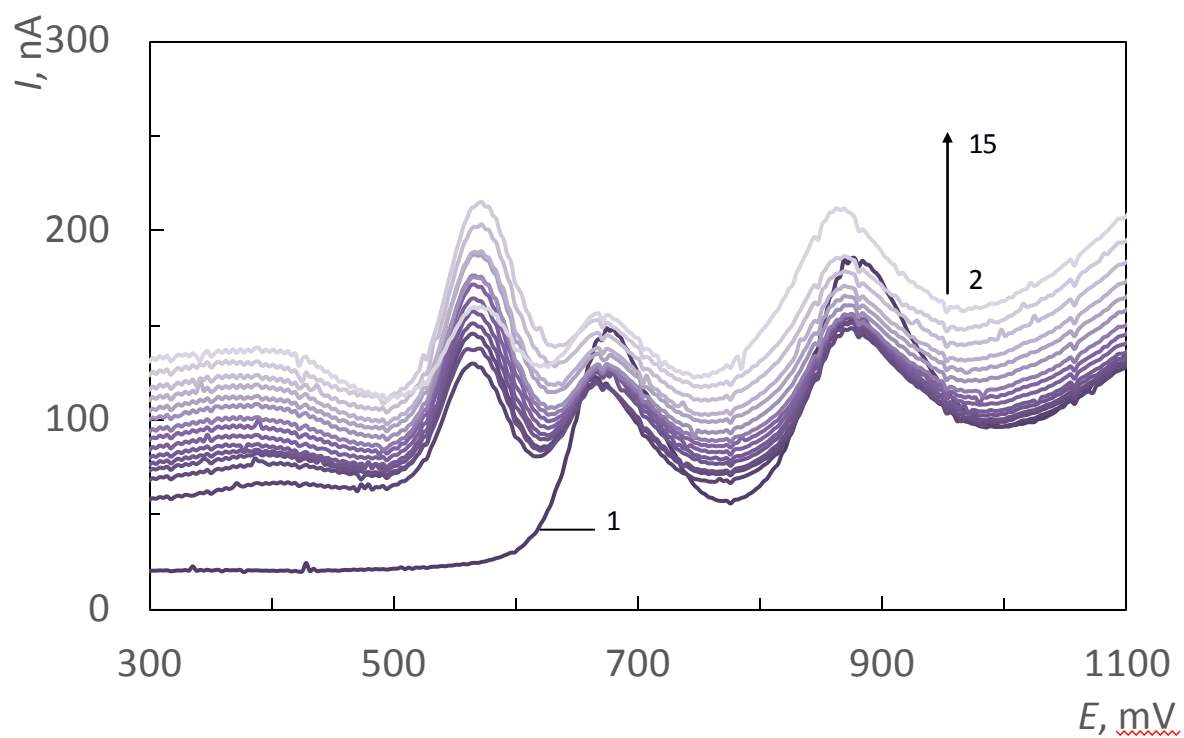
pH	HVA [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	VMA [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
2	2	2
7	20	5
10	20	8

4.1.3. Vliv pasivace

Ke zjištění, zda dochází k pasivaci CPE, bylo proměřeno patnáct opakovaných měření bez obnovy povrchu pracovní elektrody v prostředí BR pufru o pH 2 při koncentraci stanovovaných látek $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ – HVA (Obr. 11) a VMA (Obr. 12). Poněvadž docházelo ke snižování výšky píků se stoupajícím počtem měření, konkrétně o 42 % pro HVA, 73 a 33 % pro VMA a lze tedy usoudit, že k pasivaci elektrody dochází, je nutné obměňovat povrch před každým měřením. V obou případech můžeme pozorovat vznik produktu, který je snadněji oxidovatelný a se zvyšujícím se počtem měření se jeho proud zvyšuje. Tento jev nebyl dále studován, jelikož účelem bylo zjistit, zda je nutná obměna povrchu elektrody.



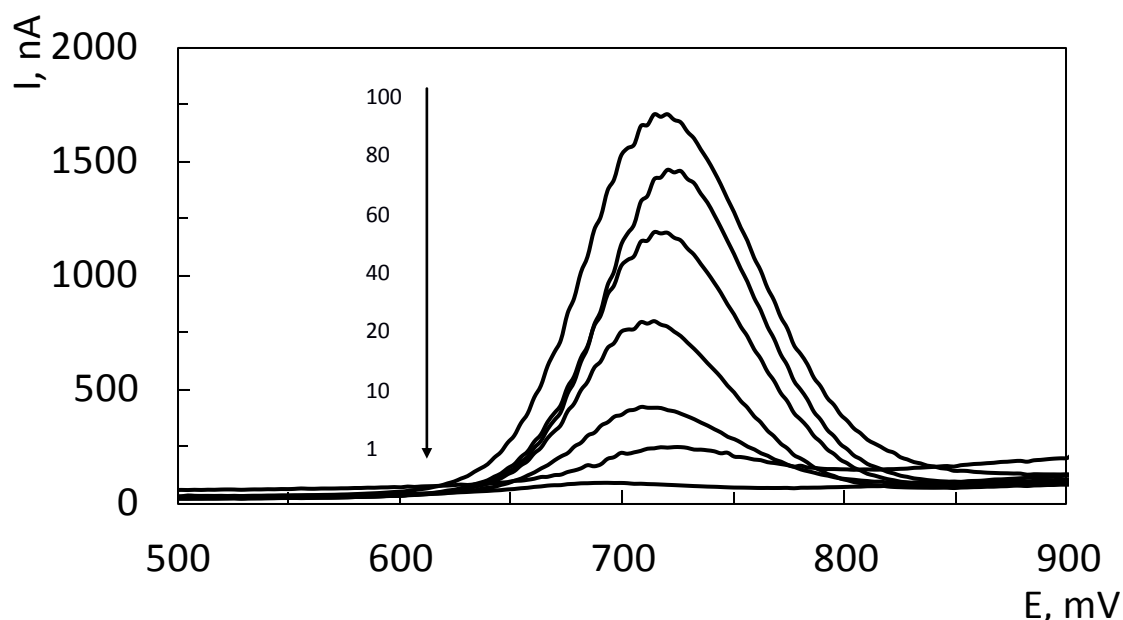
Obr. 11: Pasivace CPE. HVA o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ na uhlíkové pastové elektrodě bez otírání, $n = 15$. Měřeno v prostředí BR pufru pH 2 technikou DPV s CPE.



Obr. 12: Pasivace CPE. VMA o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ na uhlíkové pastové elektrodě bez otírání, $n = 15$. Měřeno v prostředí BR pufru pH 2 technikou DPV s CPE.

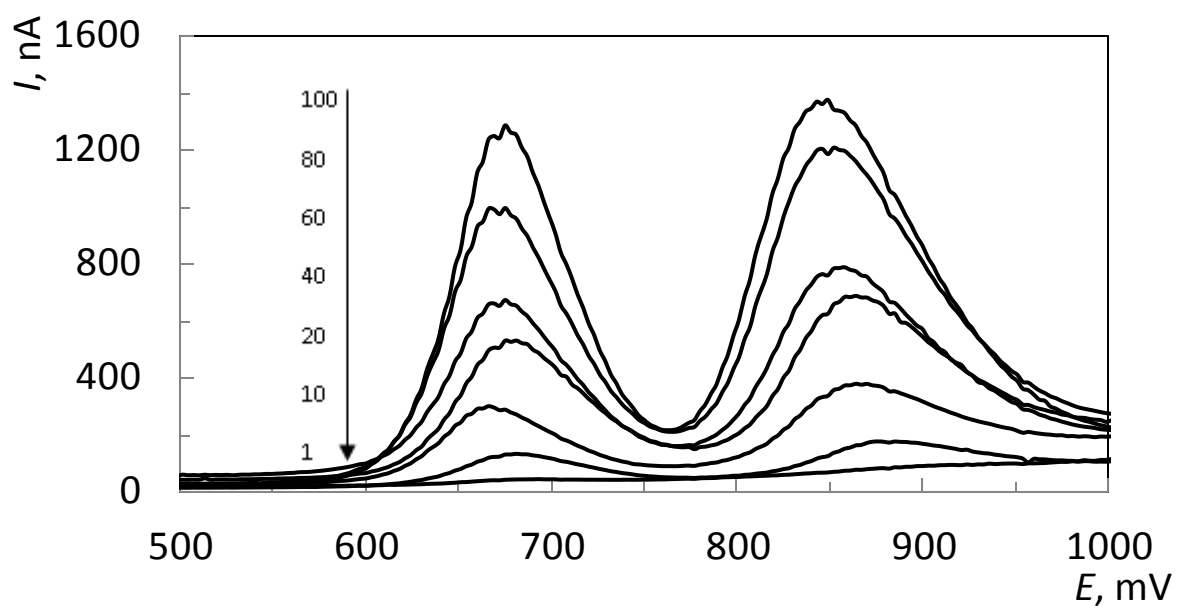
4.1.4. Koncentrační závislost HVA a VMA

Koncentrační závislosti HVA a VMA byly proměřeny v rozsahu $1 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ za zjištěných optimálních podmínek (pH BR pufru 2, obnova povrchu elektrody před každým měřením, bez akumulace). Výsledky byly zpracovány metodou lineární regrese a jsou uvedeny v tabulce 6. Voltamogramy HVA a VMA v koncentračním rozmezí $1 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ jsou uvedeny na Obr. 13 a 14, kalibrační závislost výšky píků na koncentraci jsou zobrazeny na Obr. 15 a 16. Vypočtené meze detekce jsou $0,38 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro HVA a pro VMA $0,65$ a $0,25 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ při vyhodnocení prvního a druhého píku. Relativní směrodatná odchylka měření pro nejnižší koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byla pro HVA 14%, pro VMA 13 % pro oba píky.

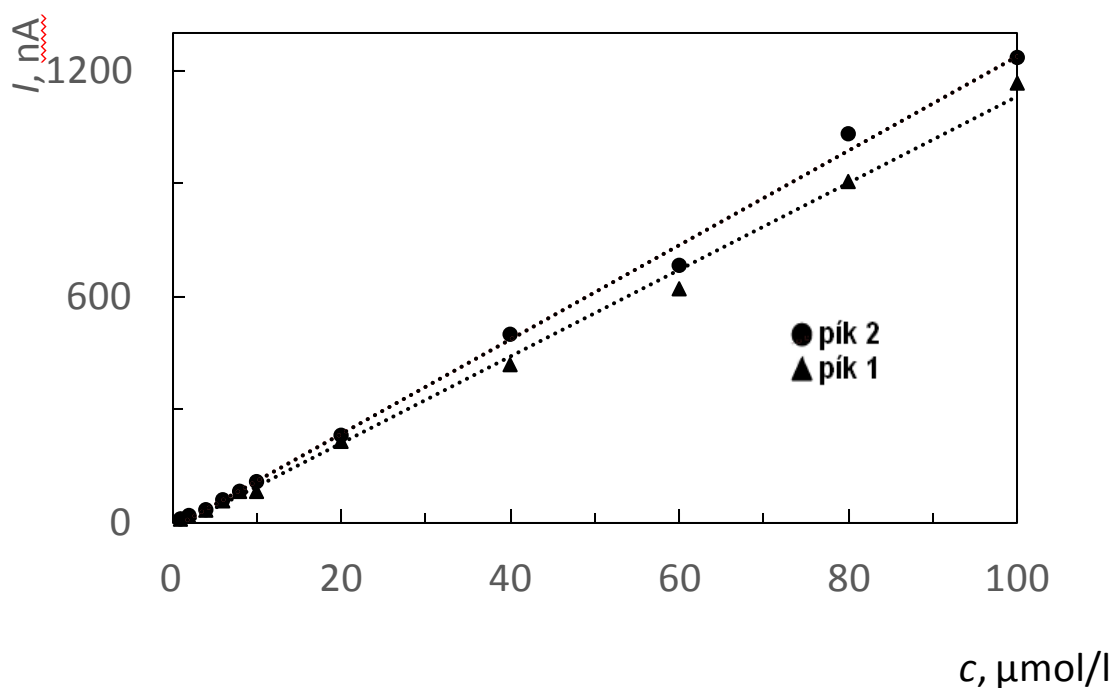


Obr. 13: Voltamogramy HVA o koncentraci 1, 10, 20, 40, 60, 80 a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

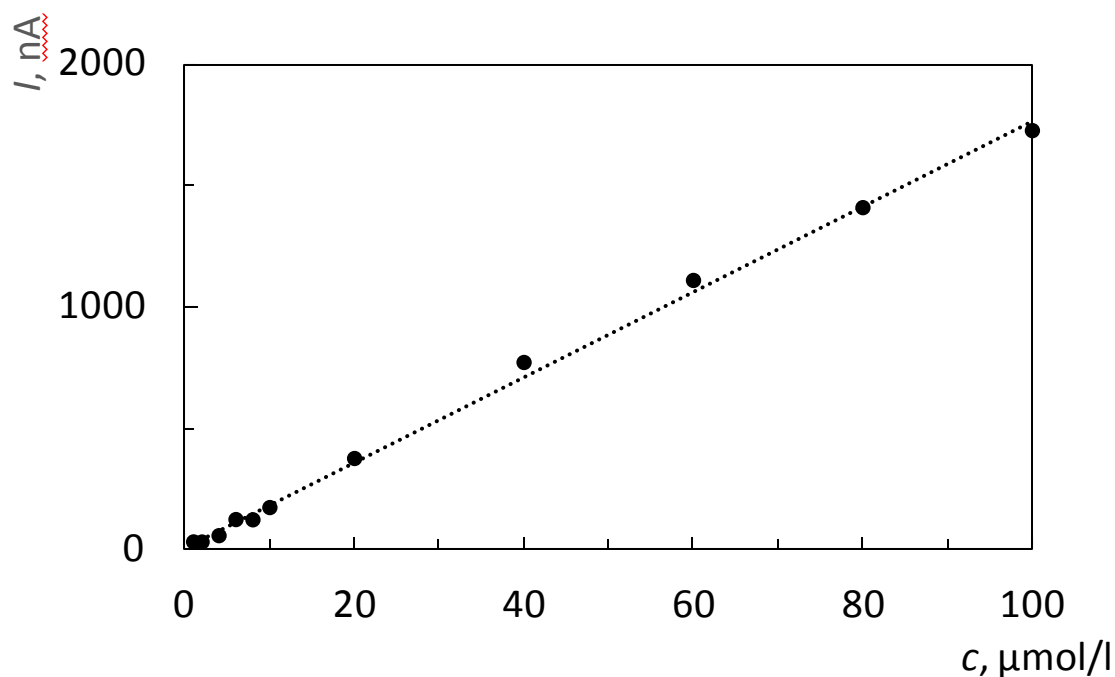
Měřeno v prostředí BR pufru pH 2 technikou DPV s CPE.



Obr. 14: Voltamogramy VMA v rozmezí koncentrací 1, 10, 20, 40, 60, 80 a $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Měřeno v prostředí BR pufru pH 2 technikou DPV s CPE.



Obr. 15: Koncentrační závislosti HVA. Měřeno v rozsahu $1 - 100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru pH 2 technikou DPV s CPE.



Obr. 16: Koncentrační závislost VMA. Měřeno v rozsahu 1 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru pH 2 technikou DPV s CPE.

Tabulka 6: Parametry kalibrační závislosti a mez detekce HVA a VMA v prostředí BR pufru o pH 2 pro DPV na CPE.

Koncentrační rozmezí [μmol·dm ⁻³]	Směrnice [mA·mol ⁻¹ ·dm ³]		Úsek [nA]		<i>R</i> ²		LOD [μmol·dm ⁻³]	
HVA								
1 - 10	16,3		3,5		0,9751		0,38	
10 - 100	17,3		30,3		0,9974			
1 - 100	17,6		7,7		0,9976			
VMA								
	Pík 1	Pík 2	Pík 1	Pík 2	Pík 1	Pík 2		
1 - 10	11,0	9,1	-5,7	-1,3	0,9930	0,9636		
10 - 100	12,6	11,2	-28,9	-48,7	0,9842	0,9901	0,65	0,25
1 - 100	11,4	12,4	- 19,5	- 16,2	0,9935	0,9916		

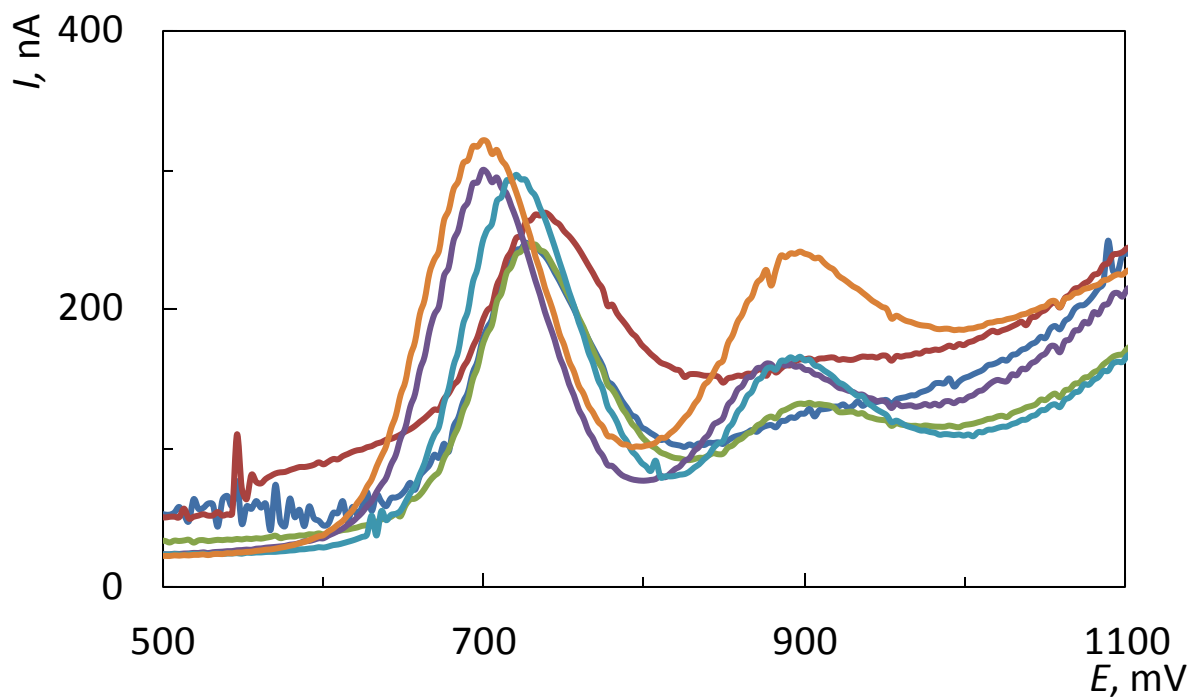
4.1.5. Koncentrační závislost pro směsi kyselin

Protože v praxi se oba studované analyty stanovují vedle sebe, bylo rovněž zapotřebí prozkoumat elektrochemické chování směsi obou standardů. Bylo zjištěno, že potenciál HVA odpovídá potenciálu prvního píku VMA (Tabulka 4) a druhý pík VMA je od ostatních oddělen dobře. Z toho důvodu lze VMA stanovit na základě druhého píku. HVA lze stanovit na základě prvního píku po odečtu známé odezvy VMA. Podmínkou tohoto stanovení je rovnost součtu proudů prvního píku ve směsi s proudy píků stanovených oddělených standardů. Byly naměřeny čtyři kalibrační grafy směsi analytů (Obr. 17 - 20). Byly použity analyty o koncentraci 1 - 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ s konstantním přídavkem druhého analytu o koncentraci 10 nebo 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Směrnice naměřených koncentračních grafů (Tabulka 7) byly srovnány se směrnici od jednotlivých analytů (Tabulka 6).

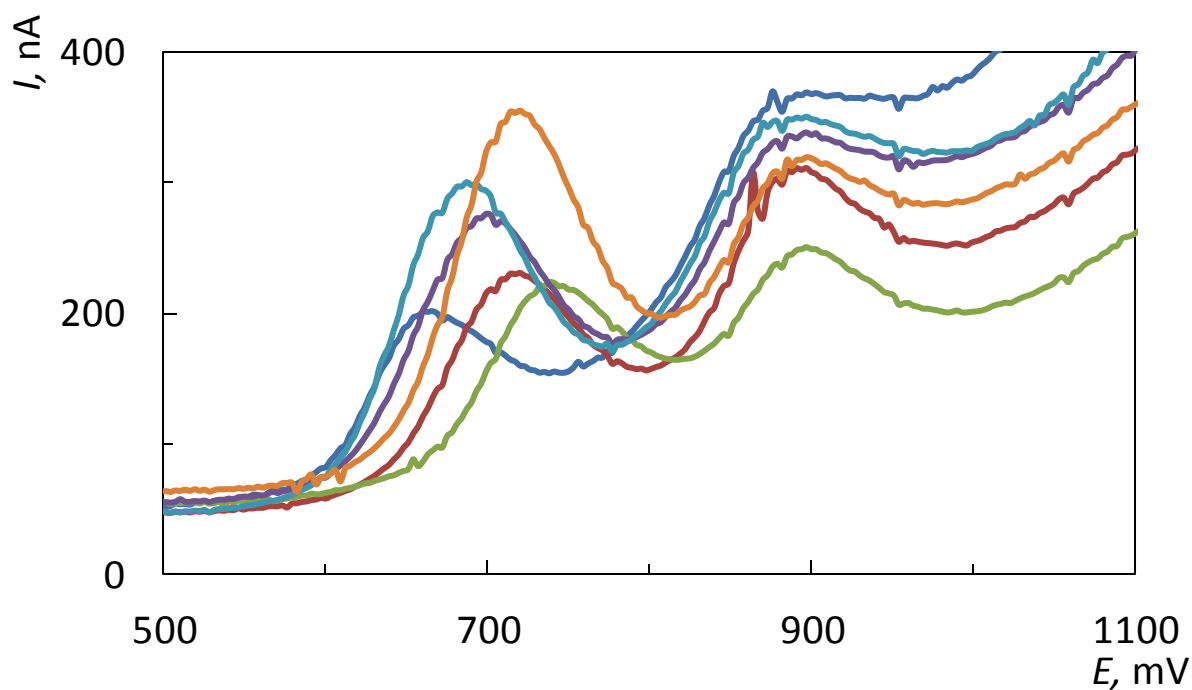
Směrnice byly porovnány s hodnotami získanými z měření samostatných standardů. Pro dobrou shodu výsledků s naměřenými standardy by měly hodnoty směrnice prvního píku směsi odpovídat směrnici standardu. Získané kalibrační křivky ukazují uspokojující shodu se standardními hodnotami jednotlivých analytů (Obr. 21 – 23). Výsledky kalibračních grafů při konstantním přídavku HVA více korespondují s hodnotami změřených při měření jednotlivých standardů.

Tabulka 7: Parametry koncentrační závislosti HVA a VMA ve směsi rozmezí 1 – 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Přídavek analytů 10 a 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, pH BR pufru 2 měřeno metodou DPV na CPE.

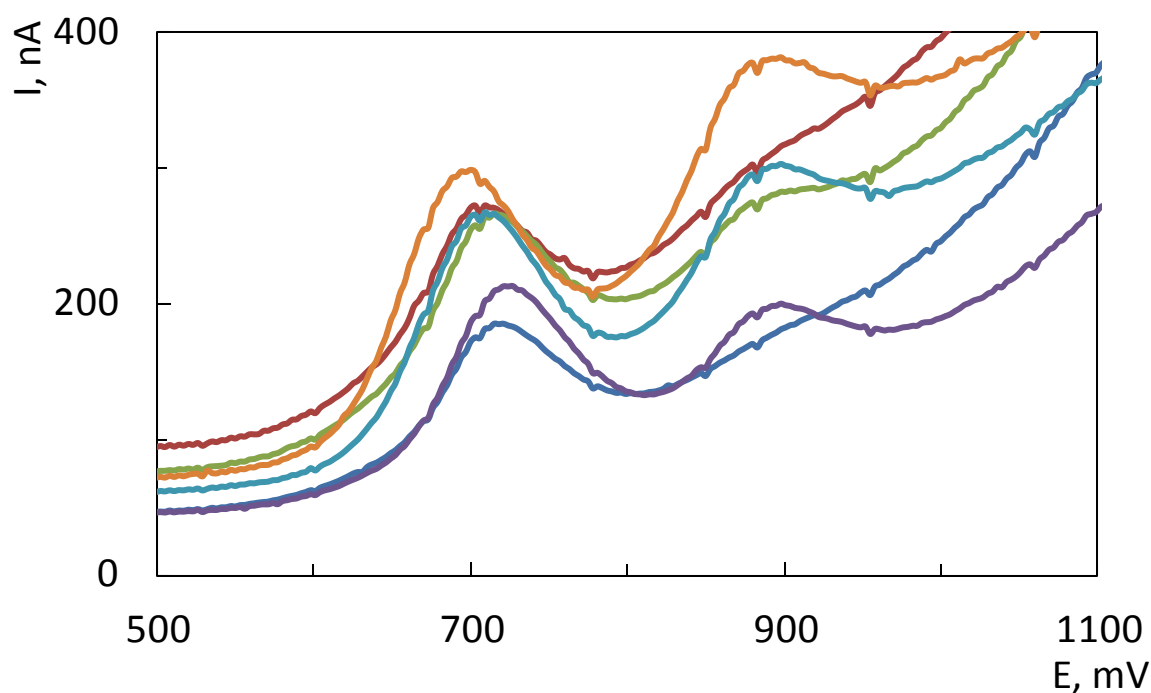
Přídavek [$\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]	HVA/10		HVA/5		VMA/10		VMA/5	
	Pík 1	Pík 2	Pík 1	Pík 2	Pík 1	Pík 2	Pík 1	Pík 2
Směrnice [mA·mol ⁻¹ ·dm ³]	11,0	10,7	6,1	9,1	18,5	-0,5	11,9	-2,3
Úsek [nA]	144,7	-4,1	81,3	-6,9	61,9	101,7	48,6	58,4
R²	0,9592	0,9825	0,9974	0,9865	0,8328	0,0117	0,8044	0,5435



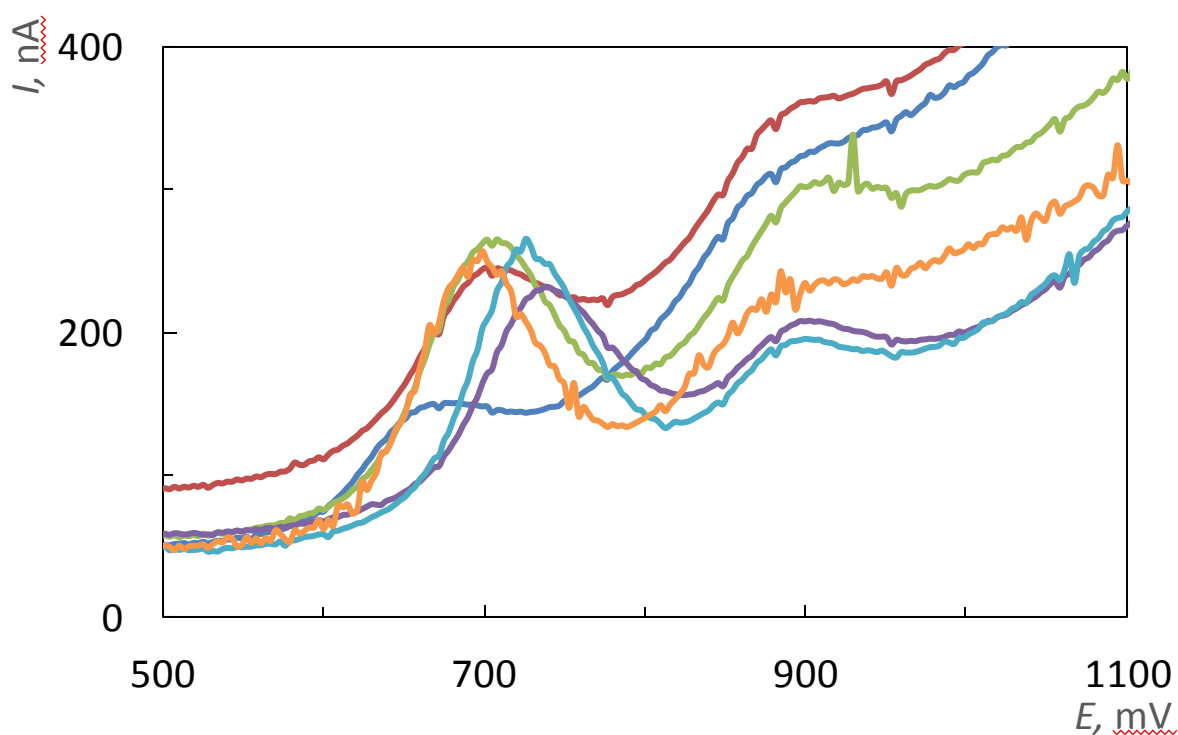
Obr. 17: DP voltamogramy koncentrační závislosti VMA s přidavkem 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HVA. Měřeno na uhlíkové pastové elektrodě v BR pufru o pH 2 v rozsahu koncentrací 1, 2, 4, 6, 8 a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



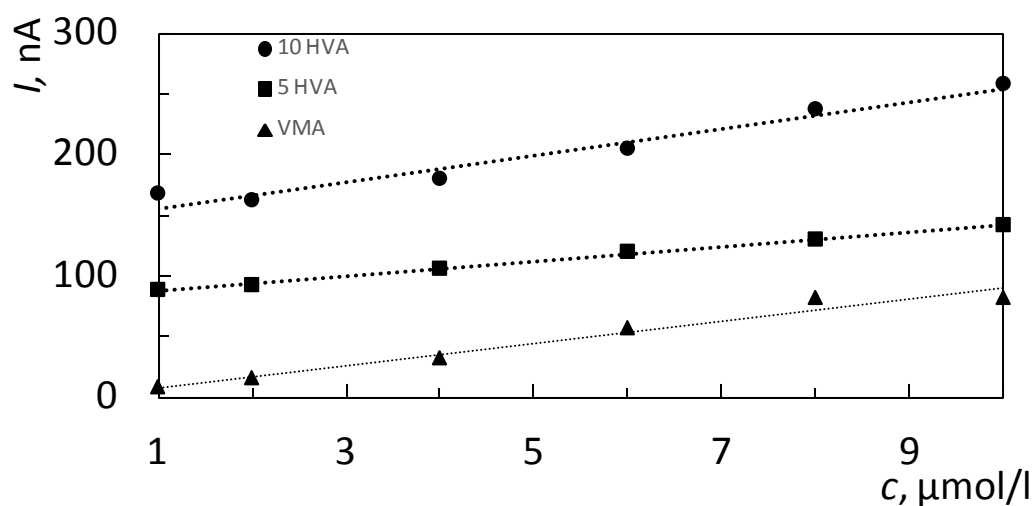
Obr. 18: DP voltamogramy koncentrační závislosti HVA s přidavkem 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ VMA. Měřeno na uhlíkové pastové elektrodě v BR pufru o pH 2 v rozsahu koncentrací 1, 2, 4, 6, 8 a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



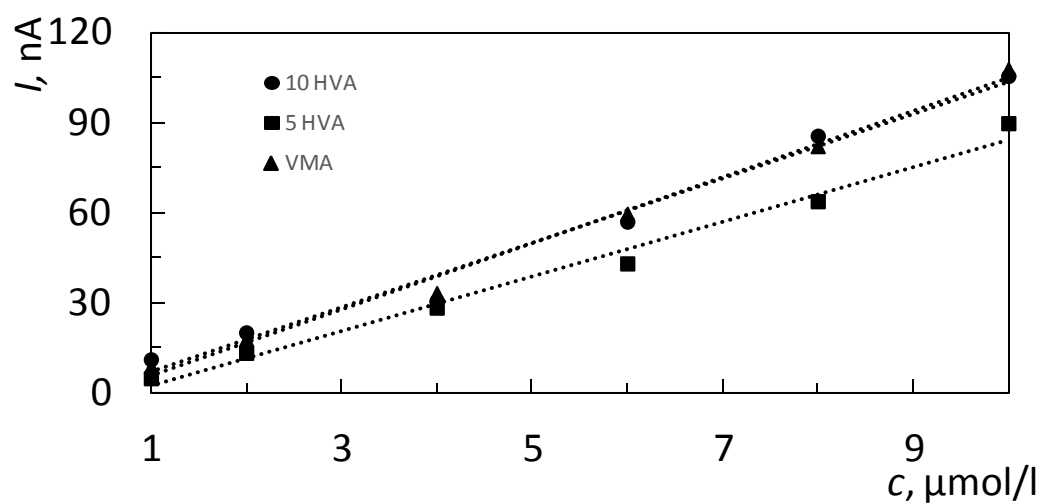
Obr. 19: DP voltamogramy koncentrační závislosti VMA s přídavkem $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HVA. Měřeno na uhlíkové pastové elektrodě v BR pufru o pH 2 v rozsahu koncentrací **1, 2, 4, 6, 8 a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.**



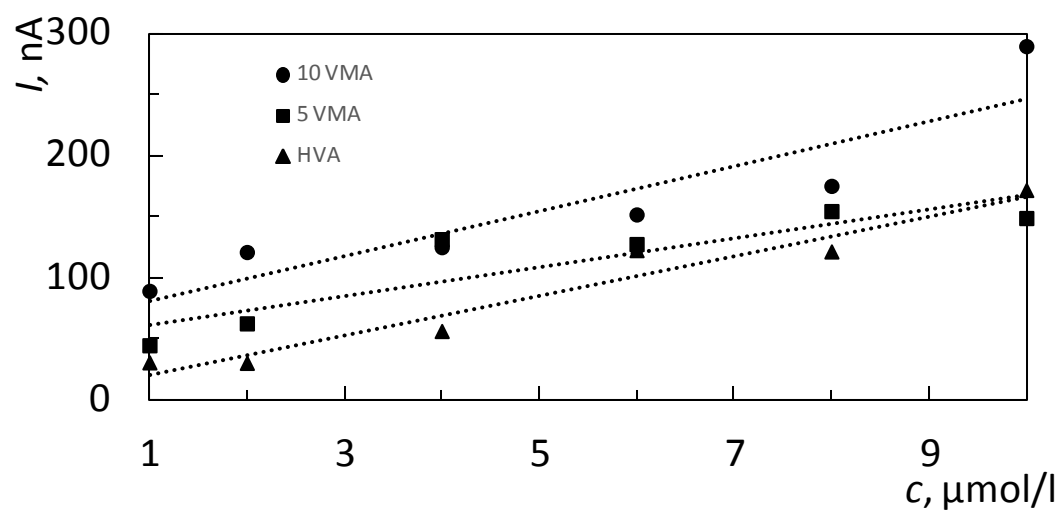
Obr. 20: DP voltamogramy koncentrační závislosti HVA s přídavkem $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ VMA. Měřeno na uhlíkové pastové elektrodě v BR pufru o pH 2 v rozsahu koncentrací **1, 2, 4, 6, 8 a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.**



Obr. 21: Kalibrační závislosti VMA/pík 1 s přidavkem 0, 10 nebo 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HVA. Měřeno na uhlíkové pastové elektrodě v BR pufru o pH 2 v rozsahu koncentrací 1-10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



Obr. 22: Kalibrační závislosti VMA/pík 2 s přidavkem 0, 10 nebo 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HVA. Měřeno na uhlíkové pastové elektrodě v BR pufru o pH 2 v rozsahu koncentrací 1-10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



Obr. 23: Kalibrační závislosti HVA s přidavkem 10 nebo 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ VMA.

Měřeno na uhlíkové pastové elektrodě v BR pufru o pH 2 v rozsahu koncentrací 1 - 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

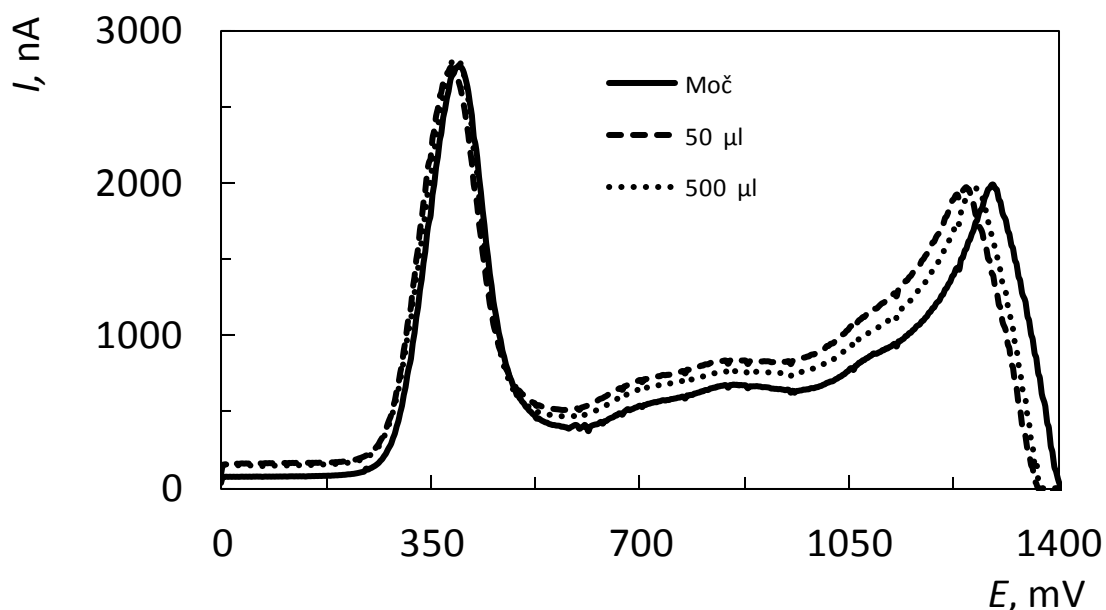
4.1.6. Voltametrické stanovení modelového vzorku

Reálný vzorek moči byl zředěn v poměru 1:1 BR pufrem o pH 2 a změřen metodou DPV na CPE. Byl připraven směsný roztok HVA a VMA o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Do odměrné baňky bylo přidáno 5 ml moči a 5 ml BR pufru o pH 2. Ze zásobních roztoků HVA a VMA byl připraven směsný roztok o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Vzorek zředěné moči byl změřen a následně bylo přidáno 50 μl směsného roztoku HVA/VMA a změřeno. Poté bylo ke stejnému roztoku přidáno 450 μl (celkově tedy 500 μl) roztoku HVA/VMA a změřeno. Výsledné voltamogramy jsou uvedeny na obr. 24.

Jak je patrné z voltamogramu, nedošlo ke změně křivky po přidavcích. Očekávané píky analytů měly být v rozmezí potenciálů 600 až 1000 mV.

Na základě předchozí práce z laboratoře¹ bylo zjištěno, že HVA a VMA nemají dostatečnou výtěžnost extrakce (47), a proto jsme extrakci neprovedli a přistoupili k HPLC.



Obr. 24: Voltamogramy modelového vzorku moči zředěného 1:1 BR pufrem o pH 2. Tučná čára znázorňuje zředěnou moč bez přidavku směsi kyselin HVA a VMA, černá čárkovaná čára znázorňuje přidavek 50 μl HVA a VMA ($c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a černá čárkovaná 500 μl HVA a VMA ($c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Změřeno metodou DPV na CPE.

¹ UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí

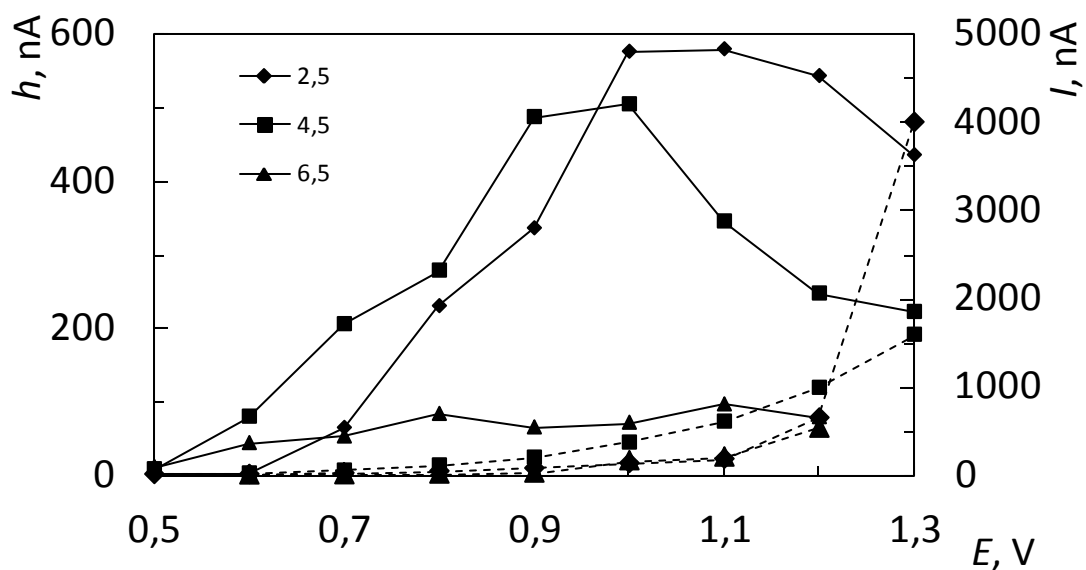
4.2. HPLC stanovení s UV a ED detekcí

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je metoda, při které dochází k rozdělení analytů mezi dvě nemísitelné fáze. K rozdělení látek dochází na stacionární fázi podle síly interakce. Jelikož se nepodařilo analyty stanovit v modelovém vzorku voltametricky, přistoupili jsme k HPLC- ED, která má větší šanci oddělit matici. HPLC-UV sloužila ze začátku pro kontrolu funkčnosti systému.

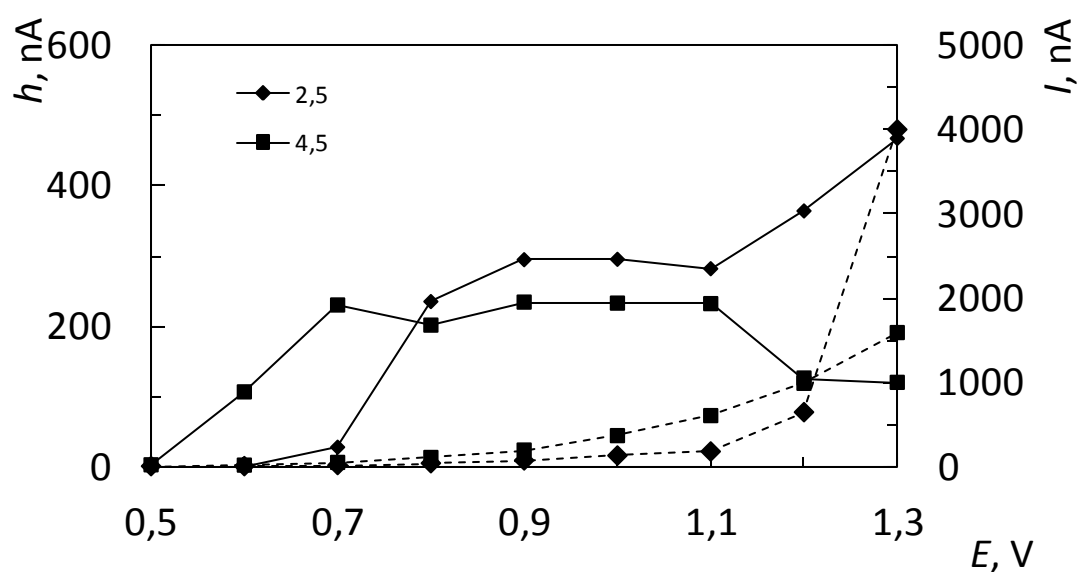
4.2.1. Hydrodynamické voltamogramy

Pro určení optimálních podmínek měření byly změřeny hydrodynamické voltamogramy, tj. závislost výšky, respektive plochy na vloženém potenciálu na pracovní elektrodu v rozsahu pH mobilní fáze 2,5; 4,5 a 6,5. Vkládané napětí bylo v rozmezí +0,5 až +1,3 V. Směsný roztok analytů HVA/VMA byl o koncentraci $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a 25% podílem acetonitrilu. Objem dávkovaného vzorku byl 20 μl . Použitá mobilní fáze byla směs acetonitrilu s fosfáto-acetátovým pufrům (25:75) a průtoková rychlost činila $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Hydrodynamické voltamogramy pro výšku píků pro VMA jsou ukázány na Obr. 25 a pro HVA v Obr. 26. Z voltamogramů je patrné, že pH má velký vliv na odezvu elektrody. Při pH 6,5 nebylo možné změřit HVA, u pH 4,5 byly výšky nižší než v případě pH 2,5. U pH 2,5 dochází k nárůstu výšky píku do potenciálu +1,1 V a následně ke snížení potenciálu pro VMA, u HVA dochází ke skokovému nárůstu do potenciálu +1,3 V. Proud pozadí se zvyšuje se zvyšujícím se potenciálem. Optimální pH mobilní fáze je 2,5, kde byly naměřeny nejvyšší hodnoty výšek píků pro VMA i HVA. Maxima těchto křivek byla při potenciálu +1,1 V.



Obr. 25: Závislost výšky píků (h) VMA na vkládaném potenciálu na CPE v mobilní fázi o pH 2,5; 4,5 a 6,5. Dávkován směsný roztok analytů o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Přerušovaná čára představuje proud pozadí (I).



Obr. 26: Závislost výšky píků (h) HVA na vkládaném potenciálu na CPE v mobilní fázi o pH 2,5 a 4,5. Dávkován směsný roztok analytů o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Přerušovaná čára představuje proud pozadí (I).

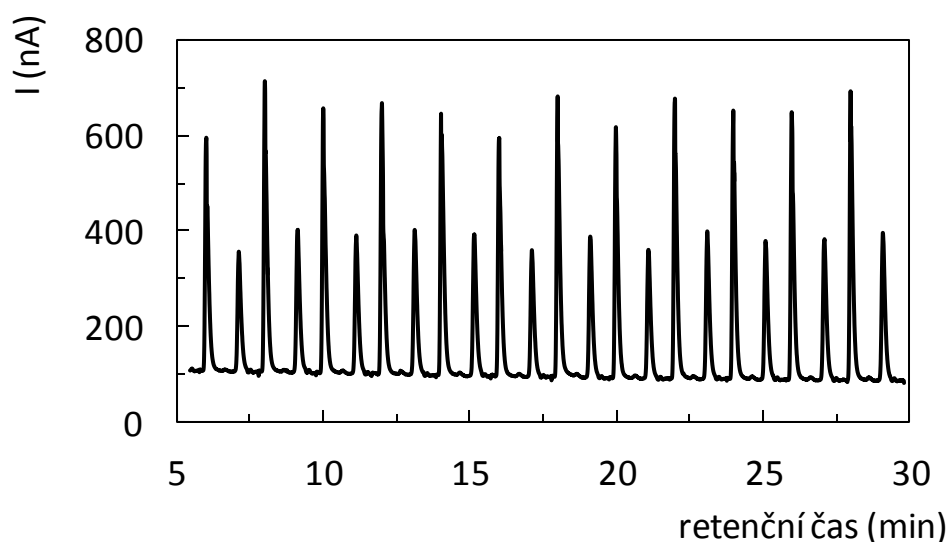
4.2.2. Opakovatelnost

Byla změřena opakovatelnost měření VMA a HVA při elektrochemické detekci na CPE za optimálních podmínek, tj. pH mobilní fáze 2,5 a vkládaném potenciálu +1,1 V. Měření byla provedena dvanáctkrát po sobě s dobou nástřiku po dvou minutách.

Výsledný chromatogram je ukázán na Obr. 27 a statistické zpracování plochy píků a výšky píků je v tabulce 8. Odezva je stabilní, s relativními směrodatnými odchylkami pro plochu a výšku píků VMA 5,16 a 5,6 % a pro HVA 4,8 % a 4,6 %.

Tabulka 8: Statistické vyhodnocení stálosti odezvy pro měření HVA a VMA s ED detekcí na CPE při potenciálu +1,1 V, kde \bar{x} je průměr, s směrodatná odchylka, s_r relativní směrodatná odchylka v %, A_p je plocha píku a h_p je výška píku.

VMA			HVA	
	A_p [nA.s]	h_p [nA]	A_p [nA.s]	h_p [nA]
\bar{x}	4254,9	560,3	2479,1	291,8
s	219,7	31,4	119,6	13,5
s_r	5,16 %	5,6 %	4,8 %	4,6 %



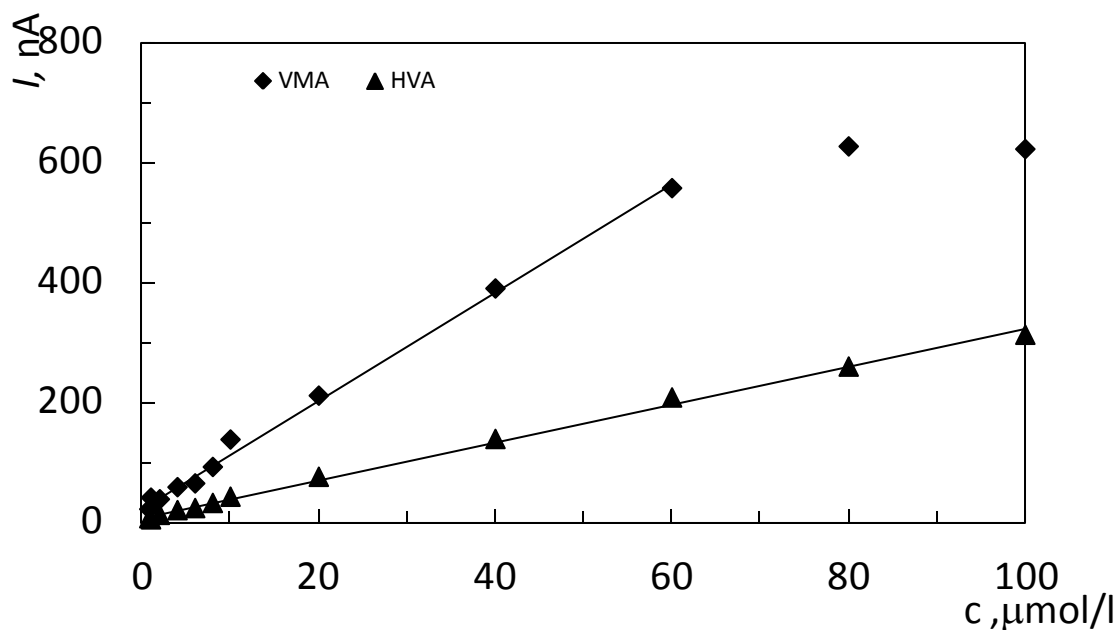
Obr. 27: Chromatogram 12 opakovaných nástřiků s měsného roztoku VMA a HVA. Dávkován směsný roztok analytů o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, mobilní fáze fosfáto acetátový pufr pH 2,5:acetonitril v poměru 75:25 (V/V).

4.2.3. Koncentrační závislost

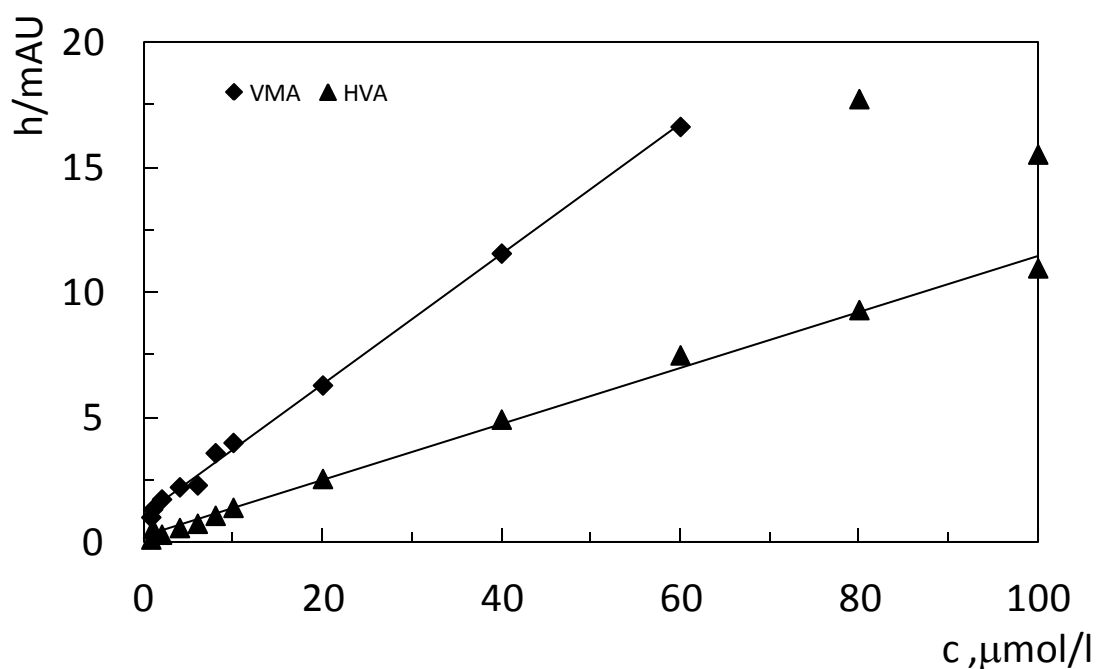
Koncentrační závislost směsného roztoku VMA a HVA s 25 % byla proměřena pomocí HPLC - ED v rozsahu koncentrací $100 - 0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ za nalezených optimálních podmínek – pH 2,5; vkládané napětí na elektrodu +1,1 V. Spektrofotometrická detekce byla při vlnové délce 271 nm.

Koncentrační závislost byla změřena spektrofotometrickou detekcí a současně elektrochemickou detekcí. Vyhodnoceny byly výšky i plochy píků a parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v tabulce 9 a 10 pro elektrochemickou detekci a v tabulce 11 a 12 pro spektrofotometrickou detekci. Kalibrační závislosti jsou v Obr. 30 a 31 pro plochy a v Obr. 28 a 29 pro výšky píků. Výsledky kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese a byly vypočteny meze detekce (Tabulka 9 - 12).

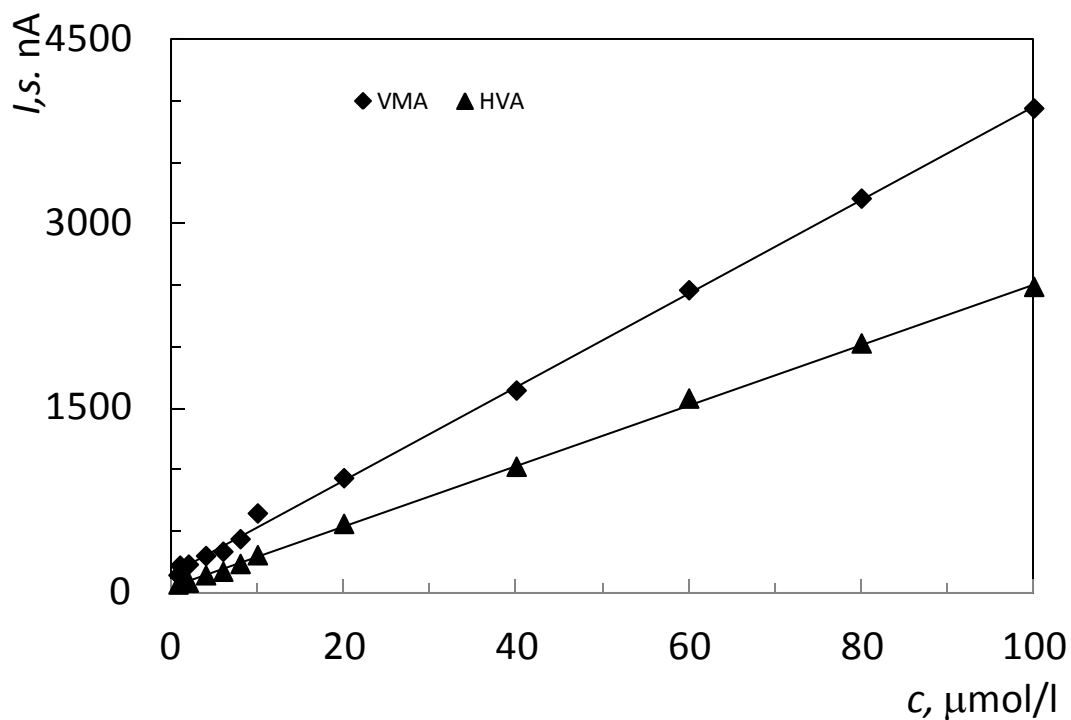
V případě vyhodnocování z výšek píků jsou koncentrační závislosti při použití spektrometrické detekce a elektrochemické detekce lineární do koncentrace $60 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Při vyhodnocování z ploch píků jsou při UV i ED detekci lineární v celém rozsahu koncentrační závislosti. Korelační koeficienty jsou v rozmezí pro ED 0,9963 – 0,9993 a pro UV 0,9958 – 0,9984. Meze detekce na CPE ve srovnání se spektrofotometrickou detekcí jsou nižší (Tabulka 9, 11).



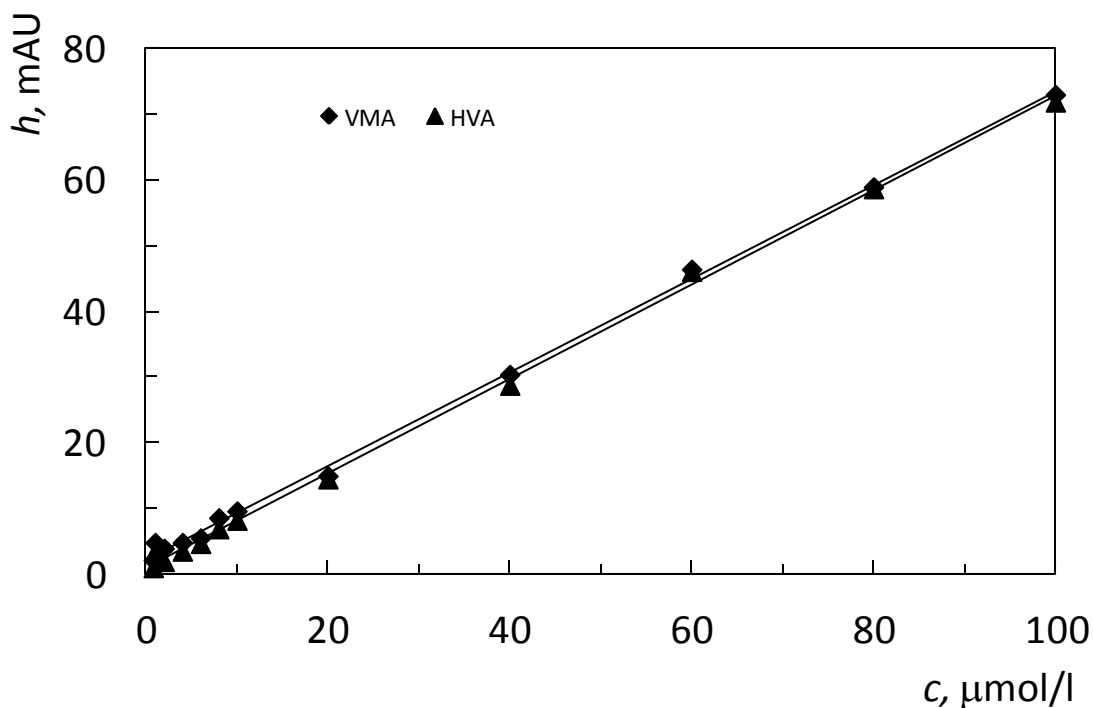
Obr. 28: Koncentrační závislosti HVA a VMA ve směsi pro výšky píků změřené pomocí HPLC – ED. Koncentrační rozmezí $1 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, mobilní fáze fosfátoacetátový pufr pH 2,5:acetonitril v poměru 75:25 (V/V).



Obr. 29: Koncentrační závislosti HVA a VMA ve směsi pro výšky píků změřené pomocí HPLC – UV. Koncentrační rozmezí $1 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, mobilní fáze fosfátoacetátový pufr pH 2,5:acetonitril v poměru 75:25 (V/V).



Obr. 30: Koncentrační závislosti HVA a VMA ve směsi pro plochy píků změřené pomocí HPLC – ED. Koncentrační rozmezí 1 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, mobilní fáze fosfatoacetátový pufr pH 2,5:acetonitril v poměru 75:25 (V/V).



Obr. 31: Koncentrační závislosti HVA a VMA v směsi pro plochy píků změřené pomocí HPLC – UV. Koncentrační rozmezí 1 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, mobilní fáze fosfatoacetátový pufr pH 2,5:acetonitril v poměru 75:25 (V/V).

Tabulka 9: Parametry kalibrační závislosti vypočtené z výšky píku a mez detekce VMA a HVA ve směsi, měřeno HPLC-ED.

	HVA	VMA
Směrnice [$\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]	3,1	9,0
Úsek [nA]	5,7	22,8
R^2	0,9973	0,9963
LOD [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	0,7	0,2

Tabulka 10: Parametry kalibrační závislosti vypočtené z plochy píku a mez detekce VMA a HVA ve směsi, měřeno HPLC – ED.

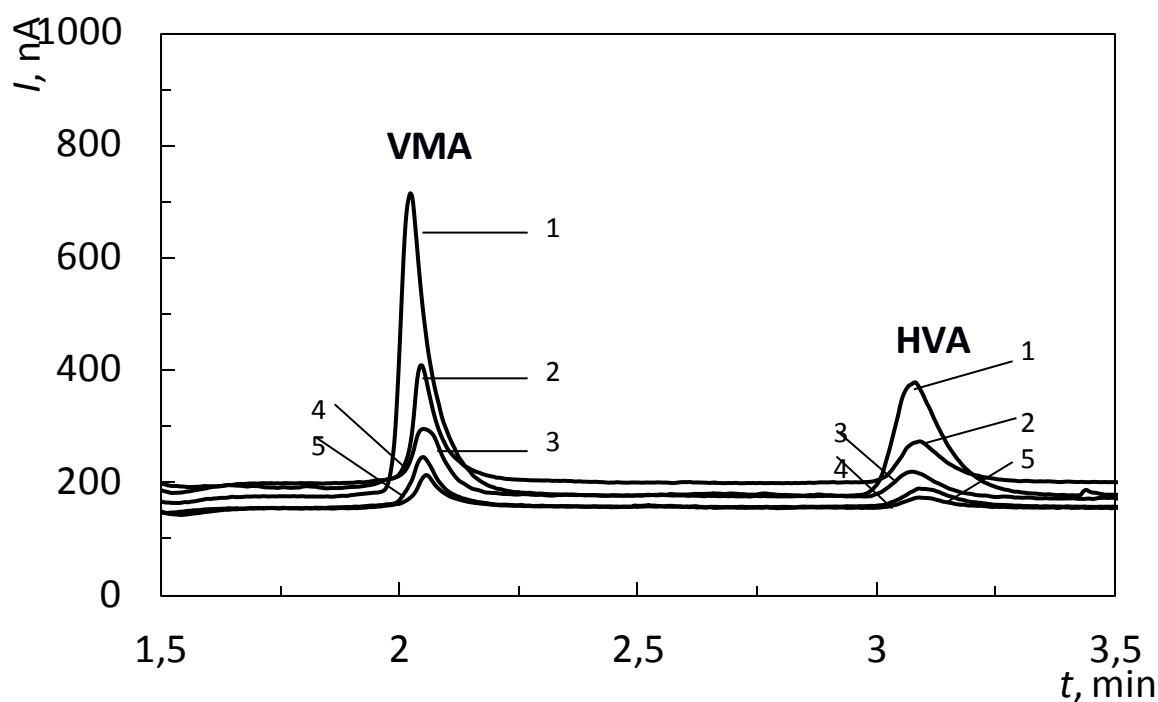
	HVA	VMA
Směrnice [$\text{mA} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]	24,7	38,1
Úsek [nA]	36,37	144,8
R^2	0,9993	0,9989

Tabulka 11: Parametry kalibrační závislosti vypočtené z výšky píku a mez detekce VMA a HVA ve směsi, měřeno HPLC – UV.

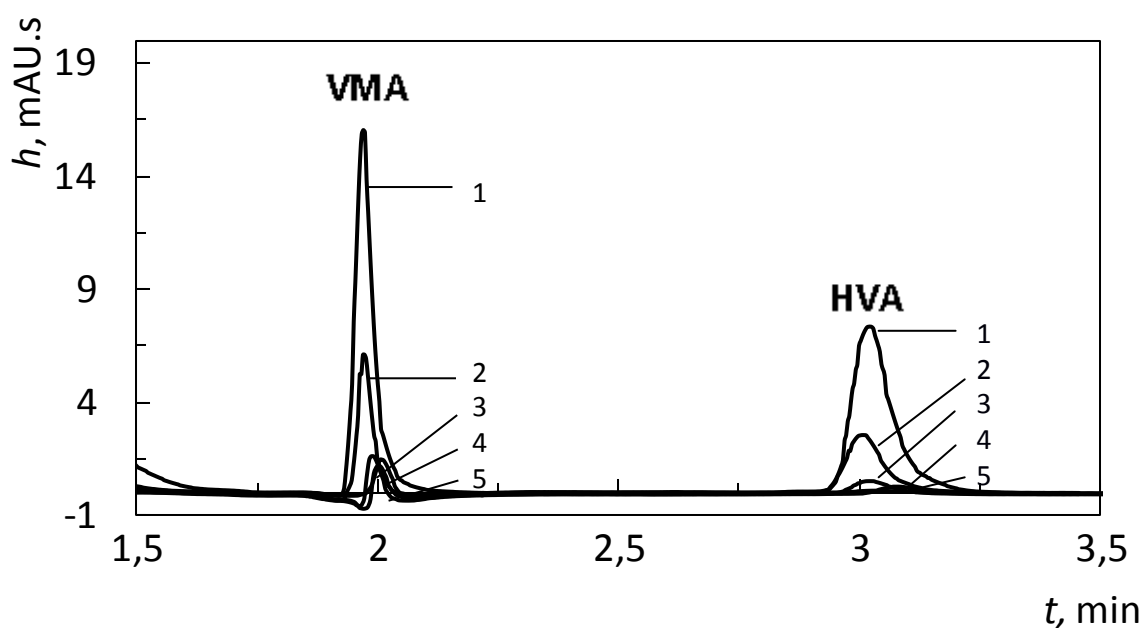
	HVA	VMA
Směrnice [$\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]	0,1	0,3
Úsek [nA]	0,2	1,1
R^2	0,9958	0,9979
LOD [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	0,9	0,4

Tabulka 12: Parametry kalibrační závislosti vypočtené z plochy píku a mez detekce VMA a HVA ve směsi, měřeno HPLC – UV.

	HVA	VMA
Směrnice [$\text{mA} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]	0,7	0,7
Úsek [nA]	0,9	2,3
R^2	0,9984	0,9984



Obr. 32: Chromatogramy koncentrační závislosti HVA a VMA ve směsi, měřeno pomocí HPLC – ED. Koncentrace 60 (1), 20 (2), 4 (3), 1 (4) a 0,8 (5) $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, mobilní fáze fosfato-acetátový pufr pH 2,5:acetonitril v poměru 75:25 (V/V).



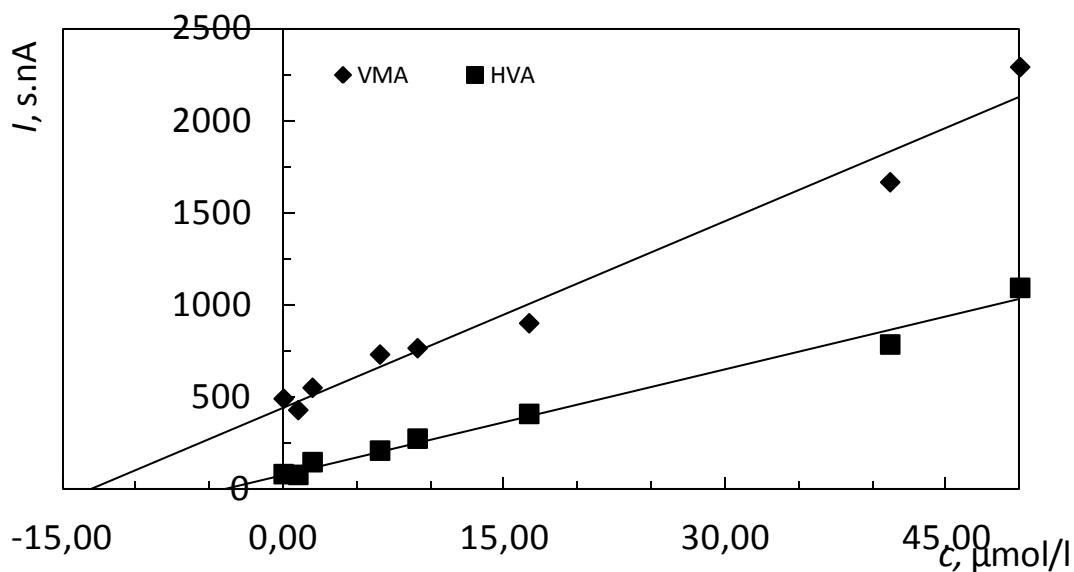
Obr. 33: Chromatogramy koncentrační závislosti HVA a VMA ve směsi, měřeno pomocí HPLC – UV. Koncentrační rozmezí 60 (1), 20 (2), 4 (3), 1 (4) a 0,8 (5) $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, mobilní fáze fosfato acetátový pufr pH 2,5:acetonitril v poměru 75:25 (V/V).

4.2.4. Modelový vzorek moči

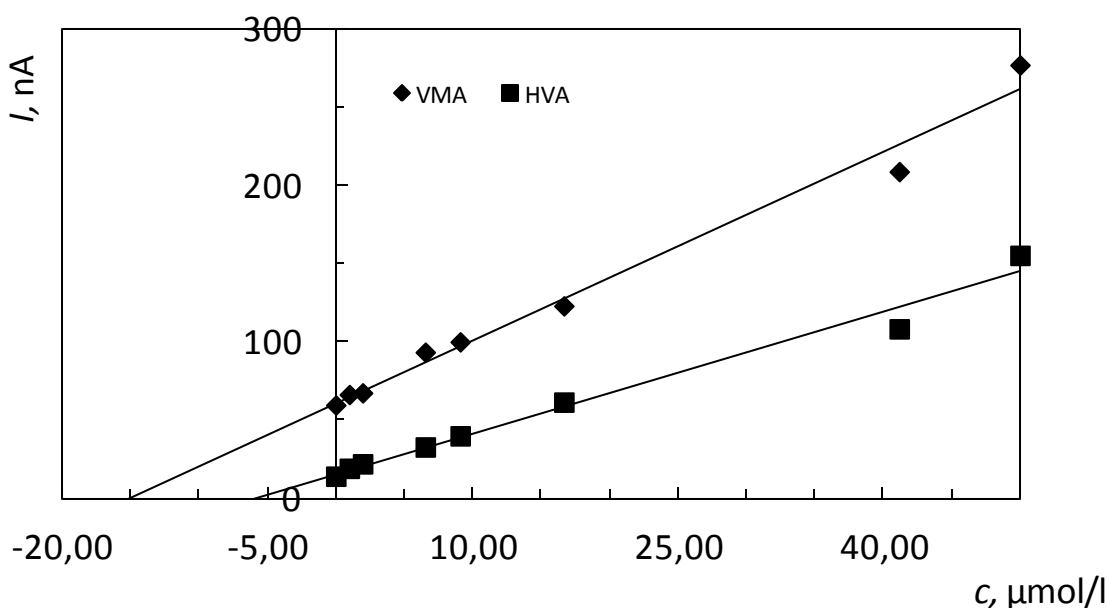
Analyty v modelovém vzorku moči byly stanoveny metodou standardního přídatku za dosažených optimálních podmínek. Standardní přídatky směsi kyselin HVA a VMA byly přidány k desetkrát zředěné moči (deionizovanou vodou). Standardní přídatky byly 100, 200, 700, 1000, 2000, 7000 a 10 000 μl do 10 ml zředěné moči ze zásobního roztoku směsi analytů $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Elektrochemická detekce probíhala při potenciálu +1,1 V. Byl použit gradientový program z důvodu překryvu VMA matricí. Počáteční poměr pufr:ACN byl 5:95 a byl lineárně měněn na poměr 75:25 během 10 minut. Retenční čas VMA je za těchto podmínek 4,2 min a u HVA je 9,1 min.

Vyhodnoceny byly výšky (Obr. 35) i plochy (Obr. 34) píků. Velikost plochy a výšky píku u desetkrát zředěné moči byl 486,2 $\text{nA}\cdot\text{s}$ a 59,3 nA pro VMA a 76,8 $\text{nA}\cdot\text{s}$ a 13,8 nA pro HVA (Obr. 36). Poté byl vypočten obsah HVA $40,5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a VMA $144,2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (plochy píků) a HVA $53,4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a VMA $147,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (výšky píků). Referenční hodnoty HVA a VMA v moči jsou $8,2 - 41 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $11,6 - 28,7 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (2).

Stanovená mez detekce je v tabulce 9, která odpovídá signálu o velikosti trojnásobku šumu. Korelační koeficient se pohybuje v rozmezí 0,9791 – 0,9874, což znamená, že kalibrační závislosti jsou lineární v celém rozsahu měření. Tyto hodnoty jsou ovlivněny interferencí matrice.



Obr. 34: Koncentrační závislosti modelového vzorku moči (10x zředěno) se standardním přídatkem HVA a VMA ve směsi pro plochy píků změřené pomocí HPLC – ED. Standardní přídavky byly 100, 200, 700, 1000, 2000, 7000 a 10 000 μl do 10 ml zředěné moči ze zásobního roztoku směsi analytů $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, mobilní fáze fosfáto-acetátový pufr pH 2,5:acetonitril v poměru 75:25 (V/V).



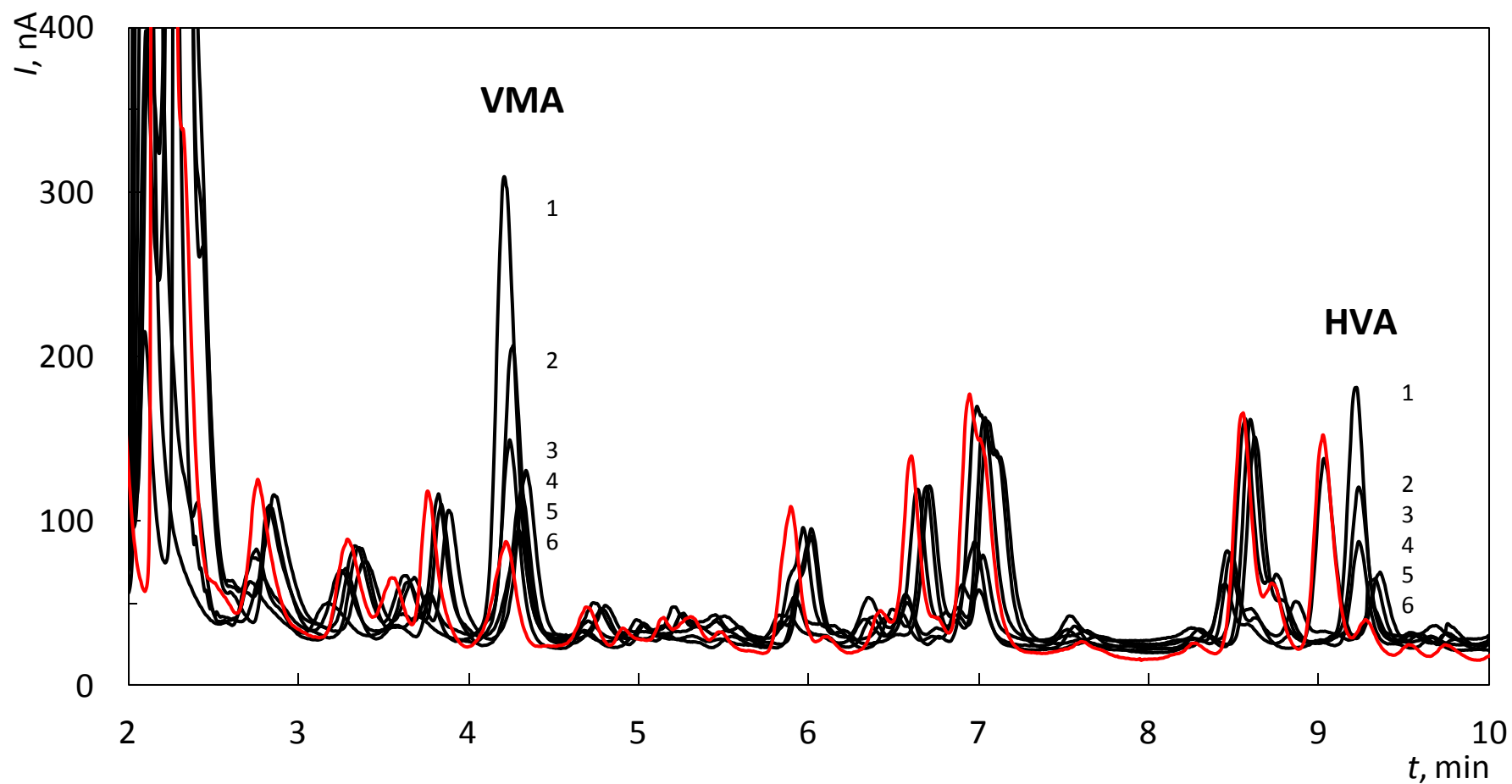
Obr. 35: Koncentrační závislosti modelového vzorku moči (10x zředěno) se standardním přídatkem HVA a VMA ve směsi pro výšky píků změřené pomocí HPLC – ED. Standardní přídavky byly 100, 200, 700, 1000, 2000, 7000 a 10000 μl do 10 ml zředěné moči ze zásobního roztoku směsi analytů $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, mobilní fáze fosfáto-acetátový pufr pH 2,5:acetonitril v poměru 75:25 (V/V).

Tabulka 9: Parametry kalibrační závislosti reálného vzorku vypočtené z výšky píků a mez detekce VMA a HVA ve směsi, měřeno HPLC – ED.

	HVA	VMA
Směrnice [$\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]	2,5	3,9
Úsek [nA]	16,1	61,5
R^2	0,9831	0,9859
LOD [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	0,8	0,5

Tabulka 10: Parametry kalibrační závislosti reálného vzorku vypočtené z plochy píků a mez detekce VMA a HVA ve směsi, měřeno HPLC – ED.

	HVA	VMA
Směrnice [$\text{mA} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]	18,7	33,3
Úsek [nA]	84,2	438,3
R^2	0,9872	0,9739



Obr. 36: Chromatogramy koncentrační závislosti HVA a VMA ve směsi (černě) a 10x zředěné moči (červeně) změřené pomocí HPLC – ED. Standardní přídavky byly 100 (6), 700 (5), 1000 (4), 2000 (3), 7000 (2) a 10000 (1) μl do 10 ml zředěné moči ze zásobního roztoku směsi analytů $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

5. Závěr

V práci byla vyvinuta metoda pro stanovení HVA a VMA za použití techniky DPV a HPLC - ED.

U voltametrického stanovení byly obě kyseliny stanoveny zvlášť v rozsahu pH = 2–12. HVA v celém rozsahu poskytovala jeden pík a VMA dva píky, které se zvyšujícím pH splývají. V obou případech docházelo se zvyšováním pH k posunu k nižším hodnotám potenciálů a ke snižování výšky píků. Jako optimální prostředí bylo vybráno pH = 2. Bylo ověřeno, že dochází k pasivaci elektrody a je nutné obměňovat povrch před každým měřením. Také bylo ověřeno, zda se analyt akumuluje na elektrodě. Výška píků se s dobou akumulace neměnila, akumulčního kroku tedy nelze využít pro zlepšení parametrů stanovení. Parametry koncentrační závislosti byly ověřeny pro VMA a HVA v rozsahu koncentrací 1–100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a bylo dosaženo meze detekce pro HVA 0,38 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pro VMA 0,65 a 0,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Jako poslední krok bylo testováno, zda je možné stanovit obě kyseliny vedle sebe, s využitím faktu, že potenciál píku HVA je téměř ve shodě s potenciálem prvního píku VMA, zatímco druhý pík VMA je od ostatních vrcholů oddělen dobře, proto lze VMA stanovit na základě druhého píku a HVA stanovit ze známé koncentrace VMA a velikosti sumárního prvního píku. Pro ověření použitelnosti tohoto postupu byly změřeny koncentrační závislosti v přítomnosti druhého analytu. Prokázali jsme, že VMA lze voltametricky stanovit vedle HVA, stanovení HVA vedle VMA má ovšem v důsledku nedokonalého překryvu obou píků pouze orientační charakter.

U HPLC stanovení byly změřeny hydrodynamické voltamogramy, ze kterých byly určeny optimální podmínky pro stanovení směsi HVA a VMA na uhlíkové pastové elektrodě. Nejlepších hodnot bylo dosaženo při pH 2,5 a potenciálu pracovní elektrody +1,1 V. Při optimálních podmínkách byly změřeny koncentrační závislosti a stanoveny meze detekce obou kyselin. Stanovené meze detekce vypočítané z výšky píků jsou pro HVA 0,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pro VMA 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Přehled dosažených LOD je v tabulce 11. Dále byly změřeny koncentrační závislosti modelových vzorků moči v koncentračním rozmezí 50 – 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a byl vypočten obsah kyselin v moči. Obsah HVA a VMA v moči byl 40,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a 144,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Při měření

s elektrochemickou detekcí byly z ploch píků stanoveny meze detekce pro HVA $0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pro VMA $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Tabulka 11: Srovnání limitů detekcí (LOD) HVA a VMA ve směsi při použití DPV (CPE), HPLC – ED (CPE) a HPLC – UV. Vyhodnocení z výšky píků.

Metoda	HVA ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	VMA ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)
DPV (CPE)	0,38	$0,65^a$ a $0,25^b$
HPLC – ED (CPE)	0,7	0,2
HPLC – UV	0,9	0,4
HPLC - ED ^c	0,8	0,5
^a VMA pík 1 ^b VMA pík 2 ^c Modelový vzorek		

6. Literatura

- (1) CAO, G.-M.; HOSHINO, T. Simultaneous determination of 3,4-dihydroxymandelic acid, 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid, 3,4-dihydroxyphenylglycol, 4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol, and their precursors, in human urine by HPLC with electrochemical detection. *Chromatographia*, 1998, 47.7-8: 396-400.
- (2) BICKER, Joana, et al. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples—A review. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 768: 12-34.
- (3) EISENHOFER, Graeme; KOPIN, Irwin J.; GOLDSTEIN, David S. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological Reviews*, 2004, 56.3: 331-349.
- (4) KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA, Joanna; MICHALSKA, Monika; RYNKOWSKI, Jacek. Vitamin supplementation reduces the level of homocysteine in the urine of autistic children. *Nutrition Research*, 2011, 31.4: 318-321.
- (5) MAGERA, Mark J., et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of vanillylmandelic acid in urine. *Clinical Chemistry*, 2003, 49.5: 825-826.
- (6) MARÍN-VALENCIA, Isaac, et al. Biochemical diagnosis of dopaminergic disturbances in paediatric patients: analysis of cerebrospinal fluid homovanillic acid and other biogenic amines. *Clinical Biochemistry*, 2008, 41.16: 1306-1315.
- (7) BARCO, Sebastiano, et al. Urinary homovanillic and vanillylmandelic acid in the diagnosis of neuroblastoma: report from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. *Clinical Biochemistry*, 2014, 47.9: 848-852.
- (8) SADILKOVA, Katerina, et al. Analysis of vanillylmandelic acid and homovanillic acid by UPLC–MS/MS in serum for diagnostic testing for neuroblastoma. *Clinica Chimica Acta*, 2013, 424: 253-257.
- (9) MANICKUM, T. Simultaneous analysis of neuroendocrine tumor markers by HPLC-electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 2009, 877.32: 4140-4146.
- (10) PISANO, John J.; CROUT, J. Richard; ABRAHAM, David. Determination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine. *Clinica Chimica Acta*, 1962, 7.2: 285-291.

- (11) BORÁŇOVÁ, Simona; ŤÁČIK, Michal. Neuroblastom. *Pediatric pro praxi*, 2012, 13.5: 335- 337.
- (12) FAULER, G., et al. Determination of Homovanillic Acid and Vanillylmandelic Acid in Neuroblastoma Screening by Stable Isotope Dilution GC-MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, 32.5: 507-514.
- (13) PACAK, Karel. Pheochromocytoma: a catecholamine and oxidative stress disorder. *Endocrine Regulations*, 2011, 45.2: 65.
- (14) ZHANG, Wen, et al. Liquid chromatography with amperometric detection using functionalized multi-wall carbon nanotube modified electrode for the determination of monoamine neurotransmitters and their metabolites. *Journal of Chromatography B*, 2003, 791.1: 217-225.
- (15) DAVIS, Kenneth L., et al. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *American Journal of Psychiatry*, 1991, 148.11: 1474-1486.
- (16) BOTTIGLIERI, Teodoro, et al. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2000, 69.2: 228-232.
- (17) ÅSBERG, Marie. Neurotransmitters and suicidal behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1997, 836.1: 158-181.
- (18) NIKOLAJSEN, Rikke PH; HANSEN, Åse Marie. Analytical methods for determining urinary catecholamines in healthy subjects. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 449.1: 1-15.
- (19) KUSHNIR, Mark M., et al. Analysis of catecholamines in urine by positive-ion electrospray tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 2002, 48.2: 323-331.
- (20) LI, Qian; BATCHELOR-MCAULEY, Christopher; COMPTON, Richard G. Electrooxidative decarboxylation of vanillylmandelic acid: voltammetric differentiation between the structurally related compounds homovanillic acid and vanillylmandelic acid. *Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114.29: 9713-9719.
- (21) LI, XiuJun; JIN, Wenrui; WENG, Qianfeng. Separation and determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 461.1: 123-130.
- (22) BLANCO-LÓPEZ, M. Carmen, et al. Electrochemical behavior of catecholamines and related compounds at in situ surfactant modified carbon paste electrodes. *Electroanalysis*, 2007, 19.2-3: 207-213.

- (23) REVIN, S. Brilians; JOHN, S. Abraham. Simultaneous determination of two important dopamine metabolites at physiological pH by voltammetry. *Analytical Methods*, 2012, 4.2: 348-352.
- (24) MASHIGE, Fumiko, et al. High-performance liquid chromatographic determination of catecholamine metabolites and 5-hydroxyindoleacetic acid in human urine using a mixed-mode column and an eight-channel electrode electrochemical detector. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1994, 658.1: 63-68.
- (25) DUTRIEU, J.; DELMOTTE, Y. A. Simultaneous determination of vanilmandelic acid (VMA), homovanillic acid (HVA) and 5-hydroxy-3-indoleacetic acid (5-HIAA) in urine by high-performance liquid-chromatography with coulometric detection. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, 1984, 317.2: 124-128.
- (26) DAVIDSON, D. F. Simultaneous assay for urinary 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid by isocratic HPLC with electrochemical detection. *Annals of Clinical Biochemistry: An International Journal of Biochemistry in Medicine*, 1989, 26.2: 137-143.
- (27) UCHIKURA, Kazuo. Fluorometric Determination of Urinary Vanilmandelic Acid and Homovanillic Acid by High Performance Liquid Chromatography after Electrochemical Oxidation. *Analytical Sciences*, 1990, 6.3: 351-354.
- (28) MERCOLINI, Laura, et al. Fast analysis of catecholamine metabolites MHPG and VMA in human plasma by HPLC with fluorescence detection and a novel SPE procedure. *Talanta*, 2009, 78.1: 150-155.
- (29) TSUNODA, Makoto. Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 386.3: 506-514.
- (30) GONZÁLEZ, Roberto Romero, et al. Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass-spectrometry (UHPLC–MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples. *Journal of Neuroscience Methods*, 2011, 198.2: 187-194.
- (31) MANINI, Paola, et al. Liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry of acidic monoamine metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, 744.2: 423-431.

- (32) FANG, Lanyun, et al. Sensitive, rapid and easy analysis of three catecholamine metabolites in human urine and serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 2012, 50.5: 450-456.
- (33) HOLLAND, Brendan J., et al. Determination of neurotransmitters and their metabolites using one-and two-dimensional liquid chromatography with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406.23: 5669-5676.
- (34) FAULER, G., et al. Determination of Homovanillic Acid and Vanillylmandelic Acid in Neuroblastoma Screening by Stable Isotope Dilution GC-MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, 32.5: 507-514.
- (35) GARCIA, A., et al. Direct measurement of homovanillic, vanillylmandelic and 5-hydroxyindoleacetic acids in urine by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2000, 871.1: 341-350.
- (36) ZHOU, Lin; GLENNON, Jeremy D.; LUONG, John HT. Electrophoretic Analysis of Biomarkers using Capillary Modification with Gold Nanoparticles Embedded in a Polycation and Boron Doped Diamond Electrode. *Analytical Chemistry*, 2010, 82.16: 6895-6903.
- (37) ŠENK, Petr; KOZAK, Libor; FORET, František. Capillary electrophoresis and mass spectrometry for screening of metabolic disorders in newborns. *Electrophoresis*, 2004, 25.10-11: 1447-1456.
- (38) PAQUETTE, Donald M., et al. Capillary electrophoresis with laser-induced native fluorescence detection for profiling body fluids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998, 714.1: 47-57.
- (39) ZHANG, Hai-tao, et al. Simultaneous determination of catecholamines and related metabolites by capillary electrophoresis with amperometric detection. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2013, 29.5: 850-853.
- (40) ZHOU, Yaping, et al. Simultaneous analysis of dopamine and homovanillic acid by high-performance liquid chromatography with wall-jet/thin-layer electrochemical detection. *Analyst*, 2013, 138.23: 7246-7253.
- (41) ADAMS, Ralph. Carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry*, 1958, 30.9: 1576-1576.
- (42) ŠVANCARA, Ivan. Možnosti inovací v elektroanalytické chemii [online]. Praha, 2006, s. 49 - 58 [cit. 2016-04-15]. ISBN 978-80-86238-16-6. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/elektroanalytika.pdf>

- (43) BAREK, Jiří, et al. Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis*, 2007, 19.19-20: 2003-2014.
- (44) ŠVANCARA, Ivan; VYTRÁS Karel. Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* 88, 1994, 138-146.
- (45) ŠVANCARA, Ivan, et al. Carbon paste electrodes in the new millennium. *Open Chemistry*, 2009, 7.4: 598-656.
- (46) ŠVANCARA, Ivan, et al. Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis. *Electroanalysis*, 2009, 21.1: 7-28.
- (47) KTENA, Evangelia. Electroanalytical detection for 3-hydroxy-4-methoxyphenylacetic acid and Hydroxy(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetic acid. Prague, 2015. Erasmus research report. Charles University in Prague. Thesis supervisor RNDr. Jan Fischer, Ph.D.